

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie

Direktor (kommissarisch): Herr Dr. med. Bernd Westphal

**Der Einfluss der Ischämiedauer auf die Modulation des Homing
von c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen in den
postkapillären Venolen des murinen Musculus cremaster**

Etablierung eines Modells
zur Analyse Ischämie-Reperfusion-Prozess-
bedingter Veränderungen am Musculus cremaster

Inauguraldissertation
zur Erlangung
des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Fabian Wildschütz, geb. am 12.01.1989 in Frankfurt (Oder)
aus Rostock

Rostock 2017

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff
(Universitätsklinikum Rostock, Klinik und
Poliklinik für Herzchirurgie)
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil Hugo Murua Escobar
(Universitätsklinikum Rostock, Klinik für
Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin)
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans K. Schackert
(Universitätsklinikum Carl Gustav Carus,
Technische Universität Dresden,
Abteilung Chirurgische Forschung)
- themenvergebender Hochschullehrer: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff
(Universitätsklinikum Rostock, Klinik und
Poliklinik für Herzchirurgie)
- Betreuer: PD Dr. med. Peter Donndorf
(Universitätsklinikum Rostock, Klinik und
Poliklinik für Herzchirurgie)

Einreichung der Dissertation am 03.03.2017

Verteidigung der Dissertation am 29.11.2017

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiaton
CFDA	Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
CSC	Kardiale Stammzellen
CSF	Colony stimulating Factor
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPO	Erythropoetin
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
HMGB-1	High-Mobility-Group-Protein B1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KL	Kit Ligand
LVAD	Left Ventricular Assist Device
M.	Musculus

MACS	Magnetic Cell Separation
MGF	Mast Cell Growth Factor
MI	Myokardinfarkt
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MV	Mecklenburg-Vorpommern
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
N	Newton
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-Segment-Elevation-Myocardial-Infarction
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGFR	Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor
PERFECT	Intramyocardial Transplantation of Bone Marrow Stem Cells for Improvement of Post-Infarct Myocardial Regeneration in Addition to CABG Surgery
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
SCF	Stammzellfaktor
SDF-1α	Stromal cell-derived Factor 1α
SLF	Steel Factor
STEMI	ST-Segment-Elevation-Myocardial-Infarction
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
V.	Vena
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Antigen

z.B.

zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Ablauf einer intrakoronaren Zelltransplantation in humanes infarziertes Myokard
- Abb. 2 Pathomechanismen des No-Reflow-Phänomens
- Abb. 3 Relative natürliche zeitliche Verläufe der für das Timing der Stammzelltherapie wichtigen Prozesse und Konzentrationen der Einflussfaktoren nach MI
- Abb. 4 Operationsbühne auf Heizplatte
- Abb. 5 Vergleichende Darstellung einer CFDA-markierten, rollenden c-kit⁺-Stammzelle mit einer nicht mit dem Endothel interagierenden Stammzelle
- Abb. 6 Vergleich der, durch IVM beobachteten, Blutflussgeschwindigkeiten in den postkapillären Venolen
- Abb. 7 Vergleich des, durch IVM beobachteten, Anteils der Rolling zeigenden c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen in den postkapillären Venolen
- Abb. 8 Vergleich der, durch IVM beobachteten, adhärenen c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen pro mm² Gefäßwandoberfläche der postkapillären Venolen

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Gruppengrößen nach Ausschluss nicht geeigneter Aufnahmen
Tab. 2	Deskriptive Statistik der Blutflussgeschwindigkeiten
Tab. 3	Deskriptive Statistik des beobachteten Rolling von c-kit ⁺ -Stammzellen
Tab. 4	Ergebnisse der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ das Rolling von c-kit ⁺ -Stammzellen betreffend
Tab. 5	Deskriptive Statistik der beobachteten Adhäsion von c-kit ⁺ -Stammzellen
Tab. 6	Ergebnisse der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ die Adhäsion von c-kit ⁺ -Stammzellen betreffend

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	15
1.1 Stammzelltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen	15
1.2 Wechselwirkungen zwischen Gewebeischämie, Inflammation, Stammzellhoming und Stammzellüberleben	22
1.3 Mesenchymale c-kit ⁺ -Stammzellen.....	24
1.4 Fragestellung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Stammzellisolation	26
2.3 Präparation der Versuchstiere	28
2.4 Intravitalmikroskopie	31
2.5 Digitale Auswertung.....	33
2.6 Auswertung und Statistik.....	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells zur Analyse Ischämie-Reperfusions-Prozess-bedingter Veränderungen am Musculus cremaster	35
3.2 Gruppengröße / Ausschlusskriterien	35
3.3 Blutflussgeschwindigkeit	36
3.4 Rolling der c-kit ⁺ -Stammzellen.....	38
3.5 Adhärenz der c-kit ⁺ -Stammzellen.....	40
4. Diskussion	43
4.1 Versuchstiere	43
4.1.1 Größe, Alter, Gewicht.....	43
4.1.2 Versuchsgruppen	44
4.1.3 Spendertiere.....	44
4.2 Aufbau des Experimentes.....	44
4.2.1 Stammzellisolation	44
4.2.2 Anästhesie.....	45
4.2.3 Präparation	46
4.2.4 Ischämie und Reperfusion	48
4.2.5 Intravitalmikroskopie	48
4.2.6 Digitale Auswertung.....	49
4.2.7 Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells zur Analyse Ischämie-Reperfusions-Prozess-bedingter Veränderungen am Musculus cremaster.....	49

4.3 Resultate	50
4.3.1 Blutflussgeschwindigkeit	50
4.3.2 Rolling der c-kit ⁺ -Knochenmarksstammzelle	51
4.3.3 Adhäsion der c-kit ⁺ -Knochenmarksstammzelle	51
4.3.4 Migrationsrelevante Zytokine, Rezeptoren und Liganden	52
5. Schlussfolgerung	55
6. Literaturverzeichnis	56
7. Selbstständigkeitserklärung	67
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9. Thesen zur Dissertation	68

1. Einleitung

1.1 Stammzelltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Folgen stellen für moderne Gesundheitssysteme in der Bundesrepublik Deutschland und den anderen westlichen Industrienationen noch vor malignen Neoplasien die größte Herausforderung dar. So betrugen in Deutschland die im Jahr 2002 direkt durch Krankheiten des Kreislaufsystems verursachten Kosten 35,4 Milliarden Euro, 15,8% der gesamten Krankheitskosten. Zusätzlich dazu entstehen einer Volkswirtschaft indirekte, nicht monetär bezifferbare Kosten durch Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und vorzeitigen Tod von Erwerbstätigen [1].

Die chronisch ischämische Herzerkrankung ist seit 1998 ununterbrochen die häufigste Todesursache in Deutschland (Stand 2014). Von den 868.356 im Jahr 2014 aufgetretenen Sterbefällen waren allein 69.890 durch diese Pathologie bedingt. Von den zehn häufigsten Todesursachen betreffen fünf das Herz-Kreislaufsystem [2].

Die in der westlichen Welt gehäuft auftretende Kombination von Bewegungsmangel, Stress, Nikotinabusus und atherogener Ernährung lässt für die Zukunft eine zunehmende Inzidenz für arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperlipidämie erwarten, alles Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose. Dies bezeichnet eine chronisch progrediente Erkrankung des arteriellen Systems, welche sich durch fibrinöse Einlagerungen in die Gefäßintima (Plauebildung) auszeichnet. Es kommt zur Einengung des Lumens, subendothelialen Cholesterinablagerung und Förderung der Bildung von reaktiven O_2 -Radikalen, welche das Endothel direkt schädigen und zusätzlich das endothelial gebildete NO inaktivieren. Dadurch entfällt dessen antiphlogistische, antiproliferative und vasodilatative Wirkung. Durch eine Ruptur der fibrösen Plauekappen und durch das geschädigte Endothel kommt es zur Aktivierung der Gerinnung und Bildung von Thromben. Die Lumeneinengung wird somit verstärkt [3, 4].

Kommt es zu einer Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien wird dies als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet. Aus der oben beschriebenen Pathogenese resultiert eine Limitierung des Blutflusses, welche zu einer Insuffizienz der Koronarien führt. Dies bezeichnet eine verminderte Koronarreserve, das verminderte O_2 -Angebot ist nicht mehr ausreichend, um den unter Belastung erhöhten O_2 -Bedarf zu decken. Klinische Konsequenz der entstehenden Myokardischämie ist die Angina pectoris. Zusätzlich kann durch Ruptur eines arteriosklerotischen Atheroms oder durch Thrombusbildung ein vollständiger oder partieller

Verschluss einer Koronararterie entstehen und damit zu einem Myokardinfarkt führen [4].

Die stabile Angina pectoris, das akute Koronarsyndrom (ACS), die ischämische Herzmuskelschädigung, Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod werden unter dem Oberbegriff der symptomatischen KHK zusammengefasst. Das ACS beinhaltet die unmittelbar lebensbedrohlichen Phasen der KHK und umfasst dabei die instabile Angina pectoris, den ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und den Myokardinfarkt mit Anstieg von Troponin und fehlender ST-Hebung (NSTEMI, Non-ST-Segment-Elevation-Myocardial-Infarction) [5].

Aktuellen Leitlinien folgend besteht die ambulante Akuttherapie eines ACS aus der titrierten Gabe von Morphin i.v., Sauerstoff, Nitraten sowie einer Antikoagulation mit Heparin und einer dualen Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und einem ADP-Rezeptorblocker wie Prasugrel oder Ticagrelor. Bei ängstlichen Patienten können zusätzlich Tranquilizer erwogen werden. Im Anschluss erfolgt der Versuch einer Reperfusionstherapie. Therapie der Wahl ist dabei die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), sollte eine Klinik mit PTCA-Möglichkeit innerhalb von 90min Transferzeit erreichbar sein und der Symptombeginn weniger als 3 Stunden zurückliegen bzw. bei sofortiger Interventionsmöglichkeit innerhalb von 3 – 12 Stunden nach Symptombeginn. Als Alternativen stehen die, auch prästationär durchführbare, medikamentöse Thrombolyse und eine Bypass-Operation zur Verfügung [6].

Durch eine erfolgreiche Reperfusion wird jedoch nicht allen, durch einen myokardialen Infarkt ausgelösten, pathologischen Vorgängen Einhalt geboten. So wird durch die Reperfusion zwar die zum akuten Zelluntergang führende Ischämie beseitigt, indes schließen sich dem akuten Infarktgeschehen hämodynamisch relevante Umbauvorgänge an. Diese vor allem nach ausgedehnten und transmuralen Infarkten auftretenden Alterationen betreffen sowohl das Infarktareal als auch nicht direkt geschädigte Bereiche. Dieser Prozess wird als ventrikuläres Remodeling bezeichnet. Im Infarktareal folgt der akut aufgetretenen Nekrose eine Ödembildung und Entzündungsreaktion. An diese schließt sich die bindegewebige Narbenbildung an, welche etwa 6-8 Wochen nach Infarkt abgeschlossen ist. Die Narbe stellt jedoch kein inaktives, sondern vielmehr ein dynamisches, vaskularisiertes, metabolisch aktives und kontraktiles Gewebe dar [7]. Noch vor, aber auch nach Abschluss der Narbenbildung kann eine Vergrößerung des von Umbauvorgängen betroffenen Gebietes beobachtet werden, bedingt durch eine akute Dilatation und Verdünnung des Infarktareals, welche nicht durch zusätzliche myokardiale Nekrose sondern durch Rearrangement der Myozytenbündel zustande kommt [8]. Die Einsprossung von narbigen Bindegewebe führt zur Verknüpfung der auseinanderklaffenden Myozytenfasern und verhindern so eine Progression der Ausdünnung [9]. Aufgrund der stark begrenzten Fähigkeit zur Mitose von adulten Kardiomyozyten kommt es anstelle von Zellproliferation zum Ersatz des

untergegangenen Gewebes zu zellulärer Hypertrophie in den nichtinfarzierten Bereichen [10]. Die durch diese Umbauvorgänge entstehende akute Herzinsuffizienz kann sich potentiell teilweise bereits innerhalb der ersten zwei Wochen zurückbilden, häufig ist jedoch ein Fortschreiten in ein chronisches Pumpversagen aufgrund einer voranschreitenden Entwicklung der Strukturveränderungen [11]. Die chronisch reduzierte Auswurfleistung des linken Ventrikels führt daraufhin zu einer sekundären Volumenüberladung. Die resultierende dilatative Kardiomyopathie kann letztlich zu terminalem Herzversagen und vorzeitigem Tod des Patienten führen. Bisher bestehen die einzigen etablierten Therapien des terminalen Herzversagens in der Implantation eines Left Ventricular Assist Device (LVAD) oder einer Herztransplantation.

Die Entstehung der überdehnten Ventrikel wird durch drei Parameter beeinflusst: Infarktgröße, Heilung des infarzierten Bereiches sowie ventrikuläre Wandbelastung. Eine Modifikation dieser drei Einflussgrößen bietet die Möglichkeit das ventrikuläre Remodeling zu minimieren und damit direkt die Morbidität und Mortalität der vom myokardialen Infarkt betroffenen Patienten zu senken [12].

Während die ventrikuläre Wandbelastung vor allem medikamentös und die Heilung der durch den Infarkt verursachten Schäden durch den Verzicht auf Glukokortikoide und entzündungshemmender Medikation beeinflusst werden kann, bietet die Begrenzung der Infarktgröße den Ansatzpunkt für verschiedene Interventionsmöglichkeiten. So wird durch eine schnellstmögliche Durchführung der oben beschriebenen Reperfusionstherapien innerhalb eines Zeitfenster, in welchem die Reaktivierung der Myozyten möglich ist, eine Reduktion der Infarktgröße erreicht [13–15].

Einen weiteren Therapieansatz mit Einfluss auf die Infarktgröße veröffentlichten Orlic et al. im Jahr 2001. Zum ersten Mal gelang tierexperimentell unter Verwendung von adulten, multipotenten $c\text{-kit}^+$ -Knochenmarkstammzellen die *in vivo*-Züchtung von Myozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen *de novo*, wobei sich aus letzteren beiden vaskuläre, das neugebildete, funktionsfähige Myokard versorgende Strukturen bildeten [16].

Dabei bestand ein weiteres Novum dieser und anderer zeitgleich erscheinender Arbeiten im Nachweis des Differenzierungsvermögens der verwendeten Stammzellen. Während vormals ausschließlich eine Differenzierung der postnatal gereiften Stammzellen zu Zelltypen ihres Herkunftsgewebes angenommen wurde, konnte hier eine deutlich größere Variabilität der entstehenden Zelllinien gezeigt werden [16, 17].

Die Fähigkeit von hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen zur Differenzierung in Myokard wurde im Folgenden aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit jedoch von einigen Arbeitsgruppen nicht bestätigt. Obwohl generell eine verbesserte ventrikuläre Funktion durch die

durchgeführte Stammzelltherapie beobachtet werden konnte, scheint diese laut aktueller Theorien eher in einer verstärkten Angiogenese und einer verbesserten Resistenz der Myozyten gegen proapoptotische Signale begründet zu sein [18, 19].

2004 postulierten Vandervelde et al., dass die bestmögliche stammzellbasierte Therapie des myokardialen Infarktes aus einer Kombination der drei Therapieansätze Transplantation adulter Stammzellen, Verstärkung der Freisetzung von Knochenmarkstammzellen und Beeinflussung von lokalen Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Verbesserung von Migration und Überleben der Stammzellen bestehe [10].

Der Entdeckung der Möglichkeit zur myokardialen Regeneration aus patienteneigenem Stammzellmaterial folgten eine Vielzahl weiterer tierexperimenteller Modelle sowie klinischer Phase-1- und -2-Tests zur Untersuchung verwendbarer Zelltypen, Dosis, Frequenz, Applikationsform, der zugrundeliegenden Wirkmechanismen und der Langzeitverträglichkeit. Dabei stand nicht allein das akute Koronarsyndrom, sondern mit der chronisch ischämischen Herzmuskelschädigung eine weitere Pathologie, die ebenfalls von der Regeneration funktionsfähigen Myokards profitieren würde, im Fokus der Experimente [20 - 22].

Eine tierexperimentelle Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der applizierten Stammzelldosis und der ausgelösten Wirkung im akut infarzierten Myokard zeigte eine fehlende Dosisabhängigkeit, solange eine Dosierung innerhalb der therapeutischen Breite gewählt wurde. So führte eine vierfache Erhöhung der minimalen zu therapeutischen Effekten führenden Zellzahl zu keinen weiteren linksventrikulären Strukturverbesserungen. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl führte, vermutlich aufgrund einer Zunahme von Mikroembolien, zu erhöhter Mortalität [23]. Diese Ergebnisse entfernten eine potentielle Störgröße und eröffneten einen gewissen Spielraum bei der Festlegung der Dosierung für nachfolgende Experimente.

Eine verbreitete Möglichkeit zur Applikation der Stammzellen stellt die intramyokardiale Injektion dar. Diese ist sowohl intraoperativ, wie beispielsweise während aortokoronarer Bypass-Operationen im Rahmen der Rostocker PERFECT-Studie [19], als auch während einer Herzkatheteruntersuchung möglich. Die letztere Methode lässt sich noch in die transendotheliale und die transkoronarvenöse Injektion der Stammzellen unterteilen. Die transendotheliale Injektion stellt nach den Versuchen an Schweinen durch Fuchs et al. [24] und diverser klinischer Studien eine bezüglich verbesserter kardialer Funktion vielversprechenden Ansatz dar [25]. Die transkoronarvenöse Injektion wurde zunächst 2003 durch Thompson et al. unter Verwendung eines Tiermodelles [26] und anschließend 2005 durch Siminiak et al. im Rahmen der klinischen

Phase I-Studie POZNAN [27] untersucht. Die durchgeführten Versuche zeigten sowohl die Durchführbarkeit als auch die Sicherheit des Eingriffes. Aufgrund der geringen Testpopulation der POZNAN-Studie (n=10) steht eine finale Bewertung dieser Applikationsform jedoch noch aus. Die katheterbasierenden Verfahren bieten aufgrund ihrer geringeren Invasivität den Vorteil der Durchführbarkeit an Patienten mit hohem OP-Risiko sowie die Möglichkeit einer Wiederholung des Eingriffes. Alle Formen der intramyokardialen Injektion bieten den Vorteil eines intraoperativen bzw. durch nuklearmedizinische Bildgebung oder Echokardiografie präinterventionellen Aufsuchens der durch Infarkt und folgend beginnender Narbenbildung veränderter Bereiche des Myokards, welches eine präzise Anwendung der Stammzellen am Ort der erwünschten Wirkung ermöglicht [25].

Während vorangegangene Studien im Mausmodell ausschließlich die intramyokardiale Applikation der gewählten Stammzellpopulation praktizierten, etablierten Li, Guo et al. 2011 die intrakoronare Anwendung, welche vorher bereits an Ratten [28] und Schweinen [29] erfolgreich angewendet werden konnte. Sie konnten nach intrakoronarer Stammzellgabe eine Reduktion des linksventrikulären Remodeling und der einhergehenden Dysfunktion verzeichnen, welche der intramyokardialen Injektion ebenbürtig bis überlegen war. So beschrieben sie eine homogenere Verteilung von Stammzellen im Infarktgebiet mit folgender vermehrter Bildung von vitalen Myozyten [30].

Auch in diversen klinischen Studien wurde die intrakoronare Applikation angewandt [31]. Bei dieser Methode werden während einer PTCA des infarktauslösenden Gefäßes über das distale Ende des verwendeten Ballonkatheters multiple Dosen Stammzellen injiziert. Der Ballonkatheter verhindert dabei einen retrograden Fluss und stellt die Migration der Stammzellen in das Infarktareal sicher [32–34].

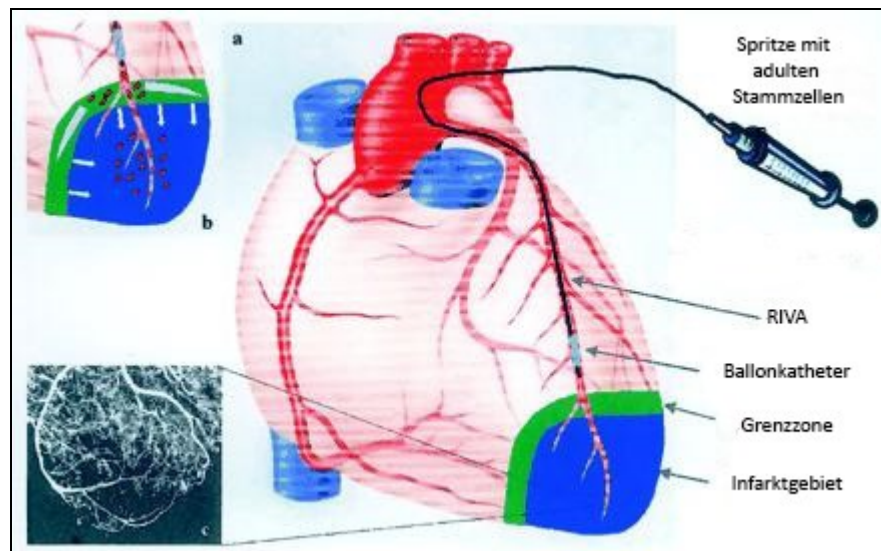


Abb. 1: Ablauf einer intrakoronaren Zelltransplantation in humanes infarziertes Myokard [34]

- a) Der Ballonkatheter wird in der infarktauslösenden Arterie oberhalb der Grenzzone des Infarktgebietes platziert und geblockt. Die Zellsuspension wird mit hohem Druck mit der Stop-Flow-Methodik infundiert.
- b) Auf diese Weise werden die Zellen über das Gefäßnetz (rote Punkte) in das Infarktgebiet transplantiert. Die blauen und weißen Pfeile weisen auf mögliche Migrationsrouten hin.
- c) Nachweis eines Blutflusses in der Infarktzone, aufgrund dessen die Zellen sowohl die Grenzzone als auch das Infarktgebiet erreichen können.

Bei der durchgeführten PTCA handelt es sich allerdings nicht um die primäre, die Perfusion wiederherstellende Intervention, sondern um einen zweiten, mehrere Tage nach dem Infarkt stattfindenden Eingriff. Die durch die Intervention hervorgerufene Ischämie führt hierbei jedoch zu einer erneuten Schädigung des Infarktareals. Durch die Okklusion einer Koronararterie durch den Ballonkatheter kommt es zum funktionellen Verlust der nachgeschalteten Arteriolen und Kapillaren durch Schädigung des Endothels, Gewebsödem und intravasale Aktivierung von Blutplättchen und Gerinnung. Zusätzlich führt bereits die Beseitigung des ischämieauslösenden Verschlusses nur zu einer teilweisen Wiederherstellung der Blutversorgung der Myozyten. Dieses als "No-Reflow" bezeichnete Phänomen scheint durch gehäuft durch Reperusionsintervention ausgelöste Mikroembolien sowie durch die Reperfusion selbst ausgelöste Kontraktion des Gewebes, Leukozytenaktivierung, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und die Verstärkung der ischämischen Schädigungsmechanismen noch zusätzlich gefördert zu werden. Je länger die Ischämiedauer, desto wahrscheinlicher scheint das Auftreten eines No-Reflow-Phänomens [35].

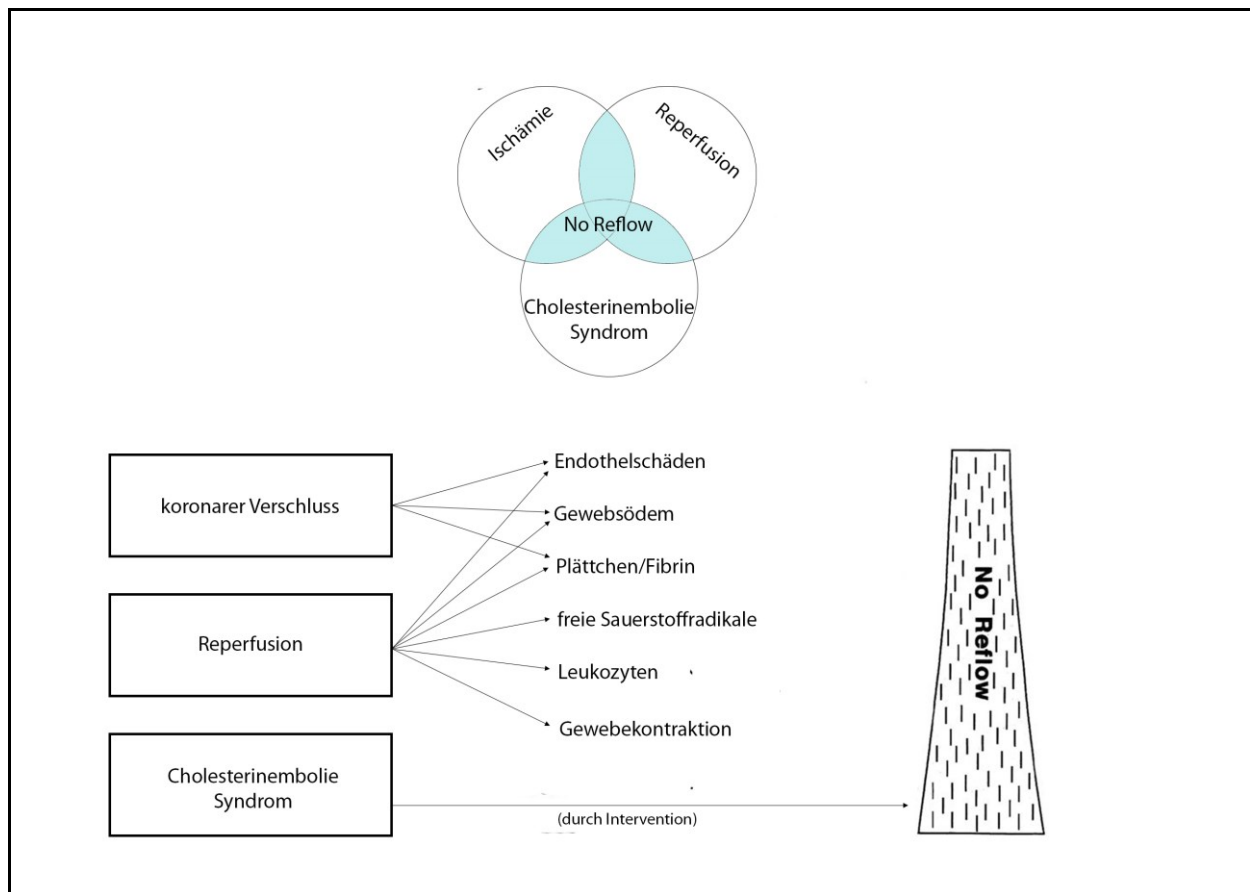


Abb. 2: Pathomechanismen des No-Reflow-Phänomens [35]

Nach Abschluss der bisherigen klinischen Phase-I und -II Studien konnte ein positives Resümee die Patientensicherheit bei kardialer Stammzelltherapie betreffend gezogen werden. So konnten keinerlei negative kardiale Ereignisse im Zusammenhang mit der Stammzellgabe dokumentiert werden. Weder funktionelle Probleme wie z.B. Herzrhythmusstörungen noch unerwünschte Umbildung von kardialen Gewebe wie Tumorstadium traten bei mit Stammzellen behandelten Patienten im Vergleich zu nur mit Reperfusionstherapie versorgten Patienten häufiger auf.

Die Wirksamkeit der Stammzelltherapie lässt sich aufgrund der noch nicht abgeschlossenen randomisierten klinischen Phase-III-Studien noch nicht abschließend beurteilen, eine positiver Effekt auf die Myokardfunktion scheint aber sehr wahrscheinlich [11]. Die deutsche multizentrische Studie PERFECT arbeitet derzeit unter Verwendung autologer CD133+-Stammzellen und intramyokardialer Injektionstherapie während aortokoronarer Bypass-Operationen am Nachweis dieser Hypothese [19].

1.2 Wechselwirkungen zwischen Gewebeischämie, Inflammation, Stammzellhoming und Stammzellüberleben

Der erste Schritt einer erfolgreichen transendothelialen Migration von Knochenmarkstammzellen in das Zielgewebe besteht in der Interaktion der Stammzelle mit dem Endothel. Bei *in vivo*-Untersuchungen dieser Interaktion konnte unter Verwendung von c-kit⁺-Stammzellen der Maus sowie humanen CD133⁺-Knochenmarkstammzellen der Einfluss diverser Faktoren wie z.B. HMGB-1[36], SDF-1 α , TNF- α [37], und der eNOS [38] auf diese Migration nachgewiesen werden. Die Freisetzung einiger dieser Faktoren, wie z.B. TNF- α , ist das Ergebnis einer proinflammatorischen Zytokinkaskade, wie sie auch durch myokardiale Ischämie ausgelöst wird [10]. Neben dem chemoattraktiven Effekt weißt TNF- α jedoch mit steigenden Konzentrationen eine verstärkte antiproliferative Wirkung gegenüber Knochenmarkstammzellen auf [39]. Darüber hinaus nimmt TNF- α gemeinsam mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen fördernden Einfluss auf die *in vivo* beobachtete Downregulation des Stammzellfaktors (SCF) nach myokardialen Infarkt [40]. SCF wiederum hat einen stammzellmobilisierenden Effekt im Knochenmark und wirkt dem kardialen Remodeling entgegen [10].

Eine Reihe von Experimenten konnte zeigen, dass die Konzentration von Homing stimulierenden Faktoren in Kleintieren nach myokardialen Infarkt akut ansteigt und bereits innerhalb von 24 Stunden ein Maximum erreicht, jedoch nach wenigen Tagen wieder abfällt [41, 42]. Beim Menschen hingegen beginnt der Konzentrationsanstieg der Angiogenese und Homing fördernden Faktoren nach 7 Tagen, welche nach 3 Wochen ein Maximum erreichen [43].

Neben dem Homing der Stammzellen ist auch deren Überleben von dem im Zielgewebe vorliegenden biochemischen Milieu abhängig. Innerhalb der ersten 7 Tage nach Infarkt kommt es zu einer vermehrten Freisetzung proteolytischer Enzyme durch neutrophile Granulozyten, einer vermehrten Bildung von Komplementfaktor C5a und des Membranangriffskomplexes sowie der Freisetzung von während der Ischämie gebildeten Sauerstoffradikalen im Augenblick der Reperfusion. Dies schafft zusammen mit der mangelhaften Durchblutungssituation eine antagonistische Umgebung für die transplantierten Stammzellen. Nach einer Woche beginnt sich die Inflammation zurückzubilden und in dem durch Granulozyten von nekrotischen Material befreiten Bereich entsteht stark vaskularisiertes Granulationsgewebe. In diesem Zeitraum sind die Umgebungsbedingungen einem Überleben der Stammzellen weitaus förderlicher. Jedoch beschränkt die bereits beschriebene Narbenbildung aufgrund der Strukturverdichtung die Möglichkeit der Ablagerung von Stammzellnestern im Gewebe [44].

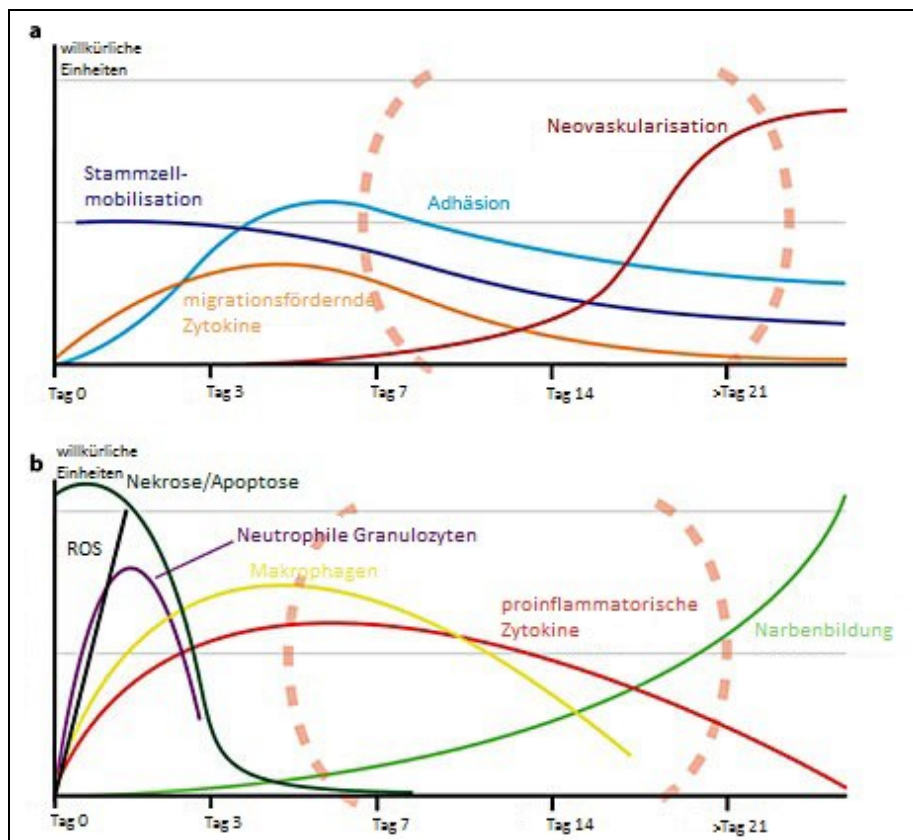


Abb. 3: Relative natürliche zeitliche Verläufe der für das Timing der Stammzelltherapie wichtigen Prozesse und Konzentrationen der Einflussfaktoren nach MI [44]

a) Faktoren mit positiven Einfluss auf den Therapieerfolg

b) Faktoren mit negativen Einfluss auf den Therapieerfolg

Das gestrichelt markierte Areal beschreibt das „window of opportunity“ für eine erfolgreiche Stammzellapplikation

Der optimale Zeitpunkt für eine Applikation von Stammzellen scheint also innerhalb eines Zeitfensters zu liegen, in dem die Interaktionen zwischen der Entzündungsantwort auf den Infarkt, der Heilung des Gewebes und der Vernarbung ein möglichst migrations- und differenzierungsförderndes und ein möglichst gering cytotoxisches Milieu schaffen [45]. Aufgrund der bisher spärlichen klinischen Beweislage wird in aktuellen klinischen Versuchen dieses "window of opportunity" zur Stammzelltherapie zwischen 2 Wochen und einem Monat nach dem Myokardinfarkt, nach Abklingen der akuten postischämischen Vorgänge und vor einem zu starken Absinken der migrationsrelevanten, ischämie-induzierten Mediatorenspiegel gesehen [19].

Eine Einflussnahme der vorbeschriebenen Pathomechanismen auf das Homing von Stammzellen und damit auf den Erfolg einer Stammzelltherapie nach myokardialen Infarkt scheint gesichert. Die Rolle der Ischämiedauer und der durch diese bedingten akuten Schäden und Änderungen in

der Expression von Chemokinen und Wachstumsfaktoren für das Stammzellhoming steht im Zentrum dieser Arbeit.

1.3 Mesenchymale c-kit⁺-Stammzellen

C-kit bezeichnet ein Protoonkogen, welches für eine transmembrale Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert. Diese, literaturabhängig auch als CD117 (Cluster of Differentiation) oder Stammzellfaktor-Rezeptor bezeichnete Kinase stellt ein Homolog zu dem viralen Onkogen v-kit dar und weist große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem colony-stimulating-factor-1-receptor (CSF-1R) und dem Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGFR) auf [46, 47].

Während die Expression von c-kit zunächst nur auf akute-nicht-lymphatische-Leukämie-Zellen und Gewebsmastzellen gesichert werden konnte, gelang 1988 der Nachweis von c-kit auf einer Population von etwa 3% normaler mononukleärer Knochenmarkszellen durch den mäuse-spezifischen Antikörper YB5.B8 [48]. Selbige Arbeit beschrieb erstmals eine Beteiligung von c-kit⁺-Zellen bei der Bildung hämatopoetischer Zellkolonien *in vitro*. Inzwischen sind neben dem Knochenmark diverse Gewebe- und Zellarten mit c-kit-Expression bekannt, so z.B. Mastzellen, Melanozyten, Testis, Brustdrüsenepithel, renale Tubuli, Schweißdrüsen, Astrozyten, Gefäßendothelien und intestinale, die Darmmotilität regulierende Cajal-Zellen [49].

Durch parallel stattfindende Forschung gelang es mehreren verschiedenen Arbeitsgruppen, den Liganden für c-kit zu identifizieren, der aus diesem Grunde unter diversen Nomenklaturen bekannt wurde. Heutzutage hat sich die Bezeichnung Stammzellfaktor (SCF) [50] gegen die Synonyme Mast Cell Growth Factor (MGF) [51], Steel Factor (SLF) [52] und Kit Ligand (KL) [53] durchgesetzt. SCF wird in Fibroblasten [54], Knochenmark-Stromazellen [55] und Endothelzellen [56] gebildet und wird sowohl membrangebunden exprimiert als auch durch proteolytische Spaltung in löslicher Form ins Serum abgegeben [57].

Die durch SCF vermittelten Funktionen sind vielfältig. So fördert der Wachstumsfaktor die Proliferation primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen und deren Überleben durch Hemmung proapoptotischer Signalwege. Je nach gleichzeitig aktiven Cofaktoren wie IL-6 oder EPO ist er an der Differenzierung der Stammzellen in verschiedene terminale Zelltypen, wie z.B. Mastzellen oder erythroide Kolonien beteiligt [49]. Auch die Migration ins Zielgewebe und die dortige Adhäsion von Knochenmarkstammzellen wird über die Interaktion zwischen SCF und c-kit mitvermittelt [58]. Die Förderung der Adhäsion kommt dabei über zwei Mechanismen zustande. Zum einen erfolgt eine direkte Verknüpfung zwischen membrangebundenem SCF und c-kit⁺-Zellen. Zum anderen bewirkt eine Aktivierung von c-kit eine höhere Bindeaffinität der β 1-Integrine VLA-4 und VLA-5 der Progenitorzellen zu den extrazellulären Matrixkomponenten

Fibronectin und Vitronectin [59–61].

Im Jahr 2003 wiesen Beltrami et al. die Existenz von c-kit⁺-Zellen im adulten Myokard von Säugetieren nach. Diese 0,01% große Fraktion des Myokards stellte eine selbsterhaltende Zellpopulation dar, die aufgrund ihres Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten umfassenden in vitro-Differenzierungsvermögens als Kardiale Stammzellen (CSC) bezeichnet wurden [62].

In der die kardiale Regeneration nach Myokardinfarkt betreffenden Forschung nutzten bereits Orlic et al. für ihre bereits erwähnte Publikation von 2001 c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen [16]. In den darauffolgenden Jahren gelang es einige auf einen Infarkt folgende physiologische Vorgänge mit Beteiligung dieses Zelltypus zu spezifizieren. So löst die kardiale Ischämie die Aktivierung des Wnt-Signalweges im Knochenmark aus. Diese Aktivierung führt zu einer verstärkten Vermehrung und Entwicklung von CD34⁺- und CD133⁺-Stammzellen [63], wobei für beide Oberflächenmarker eine Coexpression mit c-kit beschrieben wurde [64, 65]. Durch vermehrte Freisetzung von Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) und Umkehrung des kardialen Angiopoetin-1-Angiopoetin-2-Verhältnisses fördern die c-kit⁺-Zellen Reparaturvorgänge und Reperfusion des Infarktareals durch Gefäßeinsprossung im Randbereich der geschädigten Gebiete [66]. Die Beschreibung dieses Prozesses unterstützt die derzeitigen Theorien, welche eine Differenzierung der c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen zu Myozyten für unwahrscheinlich halten.

Auch in bereits abgeschlossenen und derzeit laufenden klinischen Studien finden c-kit⁺-Stammzellen Anwendung [19, 67, 11].

1.4 Fragestellungen

1. Etablieren Sie ein Modell zur *in vivo*-Analyse des Einflusses eines lokalen Ischämie-Reperfusion-Ereignisses auf das Homing von c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen
2. Untersuchen Sie den Einfluss der Dauer der Ischämie auf das durch Rolling und Adhäsion darstellbare *in vivo* Homing von c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung handelt es sich um eine prospektive, randomisierte und kontrollierte Studie. Die Genehmigung des Tierversuches erfolgte durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern unter dem Aktenzeichen 722.3-1.1-111/12.

Die verwendeten männlichen Versuchstiere der Spezies C57BL6 entstammten der Zucht der Firma Charles River (Deutschland). Sie hatten zum Durchführungszeitpunkt der Experimente ein Mindestalter von 8 Wochen und ein Körpergewicht von 23,4 – 31,1 g. Zur Gewöhnung an die Umgebung wurden die Tiere mindestens 3 Tage vor Beginn der Versuche in die Laborräume des Institutes für experimentelle Chirurgie Rostock gebracht und dort in standardisierten Käfigen gehalten. Der freie Zugang zu Wasser und Standardfutter für Nagetiere war ebenso gegeben wie ein geregelter 12-Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus. Die Raumtemperatur betrug konstant 22,8°C bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 22,8%.

Zur Beantwortung der Fragestellung erfolgte die Einteilung der Versuchstiere in 3 Versuchsgruppen. In der ersten, als Kontrollgruppe dienenden Versuchsgruppe wurde der M. cremaster von 8 Tieren vor der Intravitalmikroskopie keiner Ischämie und infolgedessen auch keiner Reperfusion ausgesetzt. In der zweiten, 8 Tiere umfassenden Versuchsgruppe betrugen Ischämie- und darauffolgende Reperfusionszeit je 15 Minuten. In der letzten Versuchsgruppe mit 6 Tieren wurde die Ischämiezeit erneut um 15 Minuten auf insgesamt 30 Minuten verlängert, die Reperfusionszeit wurde mit 15 Minuten beibehalten.

2.2 Stammzellisolation

Zur Gewinnung der murinen c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen wird ein Spendertier mit Ethanol anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Aus den Hinterläufen werden die beiden Tibiae und Femora freipräpariert und in eisgekühltes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) gegeben. Der gesamte folgende Isolationsprozess findet eisgekühlt unter einer sterilen Abzugshaube statt. Die entnommenen Knochen werden mitsamt des DMEM in eine Petrischale gegeben. Mit Hilfe einer Schere wird jeder Knochen am proximalen und distalen Ende eröffnet um Zugang zum Knochenmarksraum zu erhalten. Das Knochenmark wird nun mit jeweils 5ml MACS-Puffer (Magnetic Cell Separation) aus dem Knochen in eine frische Petrischale gespült. Um größere Verbände von Knochenmarksgewebe zu trennen, werden diese mit einer 1ml-Pipette vorsichtig mehrfach aspiriert und dispensiert. Dabei ist zu beachten, dass

die Aufwendung zu großer Scherkräfte auch zu Zellschäden führen kann. Anschließend wird die Zelllösung mit einer Pasteur-Pipette über einen mit 1ml MACS angefeuchteten 40 µm-Zellfilter in ein 50ml-Tube gegeben. Die Petrischale wird mit 5ml MACS gespült und diese Spülflüssigkeit ebenfalls in das Tube gefiltert. Die Zelllösung sollte nun homogen ohne Verklumpungen erscheinen. Ist dies der Fall, wird die Lösung in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge 10min bei 300xG zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird verworfen und die Zellen in 15ml MACS gelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wird die in Lösung befindliche Zellzahl ermittelt. Es folgt eine erneute Zentrifugation über 10min bei 300xG. Der Überstand wird erneut verworfen und das Zellsediment in einer Lösung, deren Mischverhältnis über die ermittelte Zellzahl bestimmt wird, resuspendiert. Dabei wird je 10^7 Zellen/ml 80µl MACS-Puffer und 20µl mit CD117-Antikörpern versehene, magnetische Microbeads (Miltenyi Biotec, Order Number 130-091-224) verwendet. Die Lösung wird 15min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Waschung der Zellen mit der zehn- bis zwanzigfachen Menge des verwendeten Puffers mit folgender erneuter Zentrifugation über 10min bei 300xG. Unterdessen werden zwei MACS-Trennsäulen (MS-Columns, Miltenyi Biotec, Order Number 130-042-201) in einem starken Dauermagneten platziert. Über der ersten Trennsäule wird noch ein 30µm Pre-Separationsfilter hinzugefügt. Unter den Trennsäulen erfolgt die Platzierung von 15ml-Tubes zum Auffangen der Negativfraktionen. Nach Abschluss des Zentrifugationszyklus wird der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml MACS-Puffer resuspendiert. Zunächst wird 0,5ml MACS-Puffer auf den Pre-Separationsfilter appliziert. Nachdem dieser die Trennsäule durchlaufen hat, wird die Zelllösung auf den Pre-Separationsfilter gegeben. Nachdem auch die Zelllösung die Trennsäule passiert hat und keine Tropfenbildung am unteren Ende der Säule sichtbar ist, folgt eine dreimalige Waschung der Säule mit 0,5ml MACS-Puffer. Nach Durchlauf der Waschlösung wird die Trennsäule aus dem Dauermagneten entfernt und die in der Säule zurückgebliebenen Zellen mit Hilfe von 1ml MACS-Puffer auf die zweite Trennsäule gegeben. Anschließend werden die drei Waschvorgänge wiederholt. Dieser zweite Durchlauf dient der Erhöhung der Reinheit der Isolation. Nach Abschluss der Waschung wird auch die zweite Trennsäule dem Magneten entnommen und die enthaltenen Zellen mit 1ml MACS-Puffer in ein frisches 15ml-Tube gegeben. Es erfolgt eine erneute Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer und eine erneute Zentrifugation über 10min mit 300xG.

Die Fluoreszenzmarkierung der isolierten c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen erfolgt mit CFDA (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester). CFDA ist ein membrangängiger Farbstoff, der an die freien Amine zytoplasmatischer Proteine bindet und die Zellfunktion nicht beeinträchtigt. Durch Abspaltung zweier Azetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen wird es in

das fluoreszente, weniger membrangängige CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester) umgewandelt. Die folgenden Arbeitsschritte müssen in abgedunkelter Umgebung durchgeführt werden. Zunächst werden die Zellen in sterilen, auf 37°C erwärmten PBS (Phosphat-gepufferte Saline) welches die CFDA-Molekularsonden enthält, resuspendiert. Die Lösung wird nun 15 Minuten inkubiert und anschließend 10 Minuten mit 300xG zentrifugiert, wobei die Zentrifuge mindestens Raumtemperatur aufweisen muss. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen erneut in vorgewärmten PBS resuspendiert. Es folgt eine weitere Inkubationsphase bei 37°C über 30 Minuten. Im Anschluss wird die Lösung erneut für 10 Minuten mit 300xG zentrifugiert. Abschließend werden die Zellen in 200µl PBS resuspendiert und bis zur Injektion in das Versuchstier im Inkubator gelagert.

2.3 Präparation der Versuchstiere

Bei der hier vorliegenden Präparationsanleitung, sowie der folgenden Anleitung zur Intravitalmikroskopie handelt es sich um ein 2013 von Donndorf et al. im Referenz- und Translationszentrum für kardiale Stammzelltherapie (RTC) Rostock etabliertes Modell [68].

Nach ausreichender Anästhesie des Versuchstieres mit 75 mg/kg Ketamin und 2.5 mg/kg Xylazin wird das Präparationsgebiet vorsichtig unter Verwendung eines Einwegrasierers von Fell befreit. Im ventralen Anteil des rechten Skrotums, der linken Leiste und des linken Oberschenkels müssen die Haare vollständig entfernt werden. Vereinzelte lose Haare können mit einem angefeuchteten Wattestäbchen entfernt werden.

Anschließend wird das Versuchstier in Rückenlage auf einer Operationsbühne gelagert. Die Pfoten werden durch Pflasterstreifen fixiert. Bei der Bühne handelt es sich um eine laborintern angefertigte Konstruktion, bestehend aus einer Basisplatte und eines im kaudalen Teil der Basis befestigten Quaders, welcher eine erhöhte Lagerung der Hinterbeine und des Skrotums erlaubt. Nach der Lagerung wird die Bühne auf eine auf 37°C vorgeheizte Heizplatte (Leica HI1220) positioniert, um eine konstante Körpertemperatur garantieren zu können.

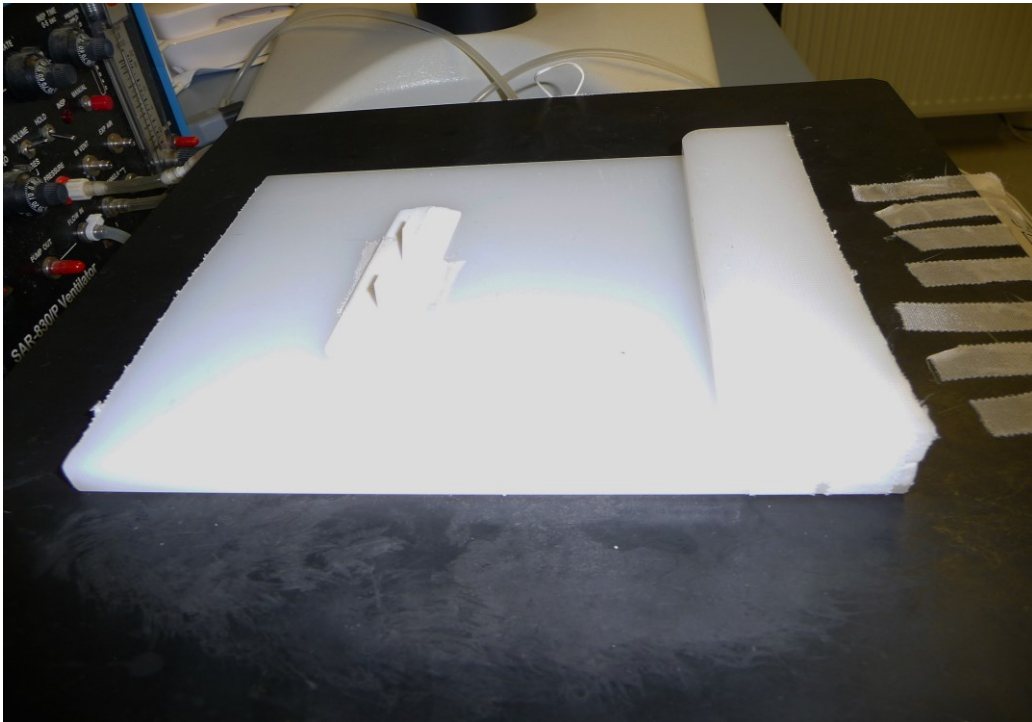


Abb. 4: Operationsbühne

Um eine gute Sicht auf das Operationsgebiet gewährleisten zu können, finden die folgenden Schritte unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leica M651) mit 10 – 16-facher Vergrößerung statt. Mit Hilfe einer Hautschere wird ventral der linken A. femoralis von Knie bis Leiste die Haut eröffnet. Nach Auffinden der A. femoralis wird selbige mit zwei Mikropinzetten vom umliegenden Fett- und Bindegewebe befreit. Es lässt sich nun ein großer, zum linken Testikel ziehender Abgang aus der A. femoralis sehen, welcher mit einem Thermokauter vom Hauptstamm getrennt wird. Es folgt die Anbringung einer oberflächlichen Haltenaht mit Prolene 6-0 am linken Testikel. Vorsichtiger Zug und Pflasterfixierung dieser Naht ermöglichen die Präparation und Mobilisation des proximalen Anteils der A. femoralis. Dabei stellt sich in der Leiste ein weiterer, nach medial ziehender Abgang der Femoralarterie dar, welcher ebenfalls mit dem Thermokauter durchtrennt wird. Weiterhin wird unter Verwendung einer Mikroschere der im femoralen Gefäß-Nerven-Bündel verlaufende N. femoralis durchtrennt und mit einer Mikropinzette entfernt.

Es folgt eine Ligatur der A. femoralis im distalen Bereich der Leiste. Die Ligatur wird unter leichtem Zug nach kaudolateral mit Pflasterstreifen fixiert, um die weitere Präparation zu erleichtern. Anschließend wird so proximal wie möglich ebenfalls eine Ligatur der Femoralarterie gesetzt, jedoch ohne den Knoten festzuziehen. Die Fadenenden werden in einer Klemme fixiert. Durch Zug an dieser Klemme kommt es nun zu einer arteriellen Knickbildung,

welche den arteriellen Blutfluss weitestgehend unterbindet. Nun folgt eine vorsichtige Stichinzision der A. femoralis mit der Spitze einer Mikroschere und die Insertion eines Mikrokatheters in das Gefäß. Es empfiehlt sich an dieser Stelle das Operationsmikroskop auf eine 16-fache Vergrößerung umzustellen. Der verwendete Mikrokatheter sollte einen Innendurchmesser von 0,28 mm haben und muss vor Verwendung mit 0,9% NaCl-Lösung entlüftet werden. Das gefäßferne Ende des Katheters ist mit einer mit 0,9% NaCl gefüllten 1ml-Spritze verbunden. Nach erfolgreicher Einführung des Mikrokatheters kann der durch die Klemme aufrechterhaltene Zug an der proximalen Ligatur gemindert und dadurch die arterielle Knickbildung aufgehoben werden. Daraufhin sollte der arterielle Blutfluss sofort im freiliegenden Teil des Katheters sichtbar werden. Der Katheter kann nun vorsichtig einige Millimeter weiter in proximale Richtung geschoben werden, wobei die Katheterspitze proximal der vorherigen Knickbildung zu liegen kommen sollte. Nun kann der vorbereitete Knoten der proximalen Ligatur festgezogen und der Katheter somit im Gefäß fixiert werden. Durch vorsichtige Spülung und Aspiration kann die korrekte Lage des Katheters überprüft werden. Um eine Gerinnung des Blutes innerhalb des Mikrokatheters zu verhindern, müssen Spülung und Aspiration in regelmäßigen Abständen, mindestens jedoch alle 5 Minuten wiederholt werden. Gleichzeitig sollte darauf geachtet werden, das Herz-Kreislauf-System des Versuchstieres nicht durch übermäßige Verwendung von Spülflüssigkeit zu überlasten. Mit Hilfe weiterer Pflasterstreifen können der Katheter und die daran befindliche Spritze an der Bühne befestigt und so zusätzlich gesichert werden. Diese Konstruktion ermöglicht die intravaskuläre Applikation der c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen, welche wie oben bereits beschrieben eine homogene Verteilung in der ischämischen Muskulatur ermöglicht.

Zur Präparation des rechten M. cremaster wird unter 10-facher Vergrößerung die ventrale Skrotalhaut und die darunterliegende Tunica dartos des rechten Skrotums mit der Hautschere durchtrennt. Dieser Schnitt wird nun kranial bis in die Leiste und kaudal bis an das distale Ende des Skrotums erweitert. Wichtig ist dabei die Schonung des unter der Tunica dartos liegenden Gewebes. Kontakt durch die Präparationsinstrumente kann zu Traumata im M. cremaster und den diesen durchziehenden Blutgefäßen führen, welche es zu vermeiden gilt. Daher folgt nun die vorsichtige Trennung des sackförmigen M. cremaster vom umliegenden Binde- und Weichgewebe sowie der Fascia spermatica externa mit Hilfe der beiden Mikropinzetten, erneut ohne den M. cremaster mit dem Instrumentarium zu berühren. Anschließend wird das distale Ende des Cremasters aufgesucht und mit einer Haltenaht versehen. Durch diese ist eine leichte Extension des Muskels möglich. Durch vorsichtige kaudale und anteriore Bewegung des

Muskelsacks ist es nun möglich das unter diesem verbleibende Weichteilgewebe zu entfernen. Anschließend wird die Haltenaht unter leichtem kaudalen Zug mit Pflasterstreifen an der Präparationsbühne fixiert. Unter Nutzung einer Klinge der Mikroschere wird nun der Muskelsack im kranialen Abschnitt eröffnet und die Inzision zum kaudalen Ende hin erweitert. Der freigelegte Testikel wird mit einer Pinzette gegriffen und vorsichtig nach anterior gezogen. Die posterior sichtbar werdenden Gefäße zwischen Testikel und M. cremaster werden mit dem Thermokauter durchtrennt und das weitere Gewebe zwischen diesen beiden Strukturen mit Schere und Mikropinzetten entfernt. Nun kann der mobilisierte Testikel außerhalb des Sichtfeldes positioniert werden. Durch vier weitere Nähte mit Prolene 6-0, welche an den Rändern des eröffneten M. cremaster an den 2-, 4-, 8- und 10-Uhr-Positionen angebracht werden, wird der Muskel aufgespannt. Die Nähte werden erneut durch Pflasterstreifen fixiert. Der offenliegende Muskel muss nun über die gesamte verbleibende Zeit des Experimentes feucht gehalten werden. Dazu wird mit Hilfe einer weiteren 1-ml-Spritze regelmäßig 0,9%ige NaCl-Lösung auf den Muskel aufgetragen.

Im hier vorliegenden Experiment folgte der Präparation in der Kontrollgruppe eine Ruhezeit von 15 Minuten ohne dass der Blutfluss manipuliert wurde. Für die in Gruppe 1 und 2 gewünschte Ischämiezeit wurden sowohl der arterielle Zu- als auch der venöse Abfluss mit Hilfe einer neurochirurgischen Klemme (Aesculap FT 250T) am proximalen Ende des M. cremaster unterbrochen. Nach Ablauf der angesetzten Ischämiezeit wurde die neurochirurgische Klemme entfernt und so die Möglichkeit für eine spontane Reperfusion geschaffen. Nach Ablauf der Ruhezeit bzw. der angesetzten Reperusionszeit wurde direkt mit der Intravitalmikroskopie begonnen. Über die Ruhe-, Ischämie- und Reperusionszeit hinweg wurde weiterhin in regelmäßigen Abständen die Aspiration und Spülung des Mikrokatheters und die Befeuchtung des M. cremaster durchgeführt.

2.4 Intravitalmikroskopie

Die Bühne und das auf ihr fixierte Versuchstier werden nun unter ein mit Auflicht (Zeiss HBO 100) modifiziertes Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiotech), welches mit einer CCD (charge-coupled device) -Videokamera (Pieper FK 6990A-IQ) verbunden ist, gelagert. Dieser Aufbau dient der Erstellung einer Videodatei über den an die Kamera gekoppelten Recorder (Panasonic DMR-EX99V), welche durch Abspielen in verlangsamer Geschwindigkeit die Auswertung der folgenden Vorgänge ermöglicht. Bei der Umlagerung der Bühne sollte dem arteriellen Mikrokatheter besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht werden. Eine Dislokation zu diesem

Zeitpunkt hätte meist einen Abbruch des Experimentes zur Folge, da eine Reinsertion des Katheters häufig nicht möglich ist oder aber, falls erfolgreich durchgeführt mit größerem Blutverlust und einer Verfälschung der Reperfusionszeit verbunden wäre. Die Betrachtung des M. cremaster erfolgt mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektives mit einem 20fachen Vergrößerungsfaktor (Olympus LUC Plan FLN) und einem ebenfalls an die Kamera gekoppelten Bildschirm (Ikegami). Schärfe und Kontrast des entstehenden Bildes werden für eine suffiziente Darstellung der Mikrozirkulation des M. cremaster angepasst. Nun werden zufällig fünf postkapilläre Venolen für die später folgenden Aufnahmen der Adhärenz festgelegt. Venöse Gefäße sind dabei durch den zum Herzen gerichteten Blutfluss erkennbar. Der Unterscheidung von arteriellen gegenüber venösen Blutgefäßen aufgrund einer arteriellen Pulsation ist eher zurückhaltend zu vertrauen, da durch die räumliche Nähe der Gefäße und dem unter Spannung gehaltenen muskulären Gewebe der Puls auch auf das venöse System übertragen werden kann. Es folgen die Injektionen der Fluoreszenz-gekoppelten CD117-Stammzellen. Dazu werden die in 200µl PBS gelösten Stammzellen vorsichtig geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Flüssigkeit gewährleisten zu können. Anschließend wird die Stammzelllösung mit einer 1ml-Spritze aufgezogen, welche dann an den arteriellen Mikrokatheter gekoppelt wird. Nun werden fünf Aufnahmen von den fünf ausgewählten postkapillären Venolen angefertigt, um das Rolling der Stammzellen am Gefäßendothel zu erfassen. Dazu wird vor jeder Aufnahme der zu untersuchende Gefäßabschnitt eingestellt und eine Injektion von etwa $0,4 \times 10^6$ Stammzellen vorgenommen. Die Aufnahme wird zeitgleich mit der Injektion gestartet. Es muss dabei auf die Beibehaltung einer ausreichenden Bildschärfe geachtet werden, da die Manipulation am arteriellen Katheter zu geringfügigen aber erkennbaren Veränderungen in der Bildebene führen kann. Die Aufnahmedauer muss nun für eine suffiziente Auswertung mindestens 60 Sekunden betragen. Da sich initiale Veränderungen in der Bildschärfe nicht immer verhindern ließen, wurde im hier durchgeführten Experiment die Aufnahmedauer auf 90 Sekunden verlängert, um einen Puffer für das Auswertungszeitfenster zu schaffen.

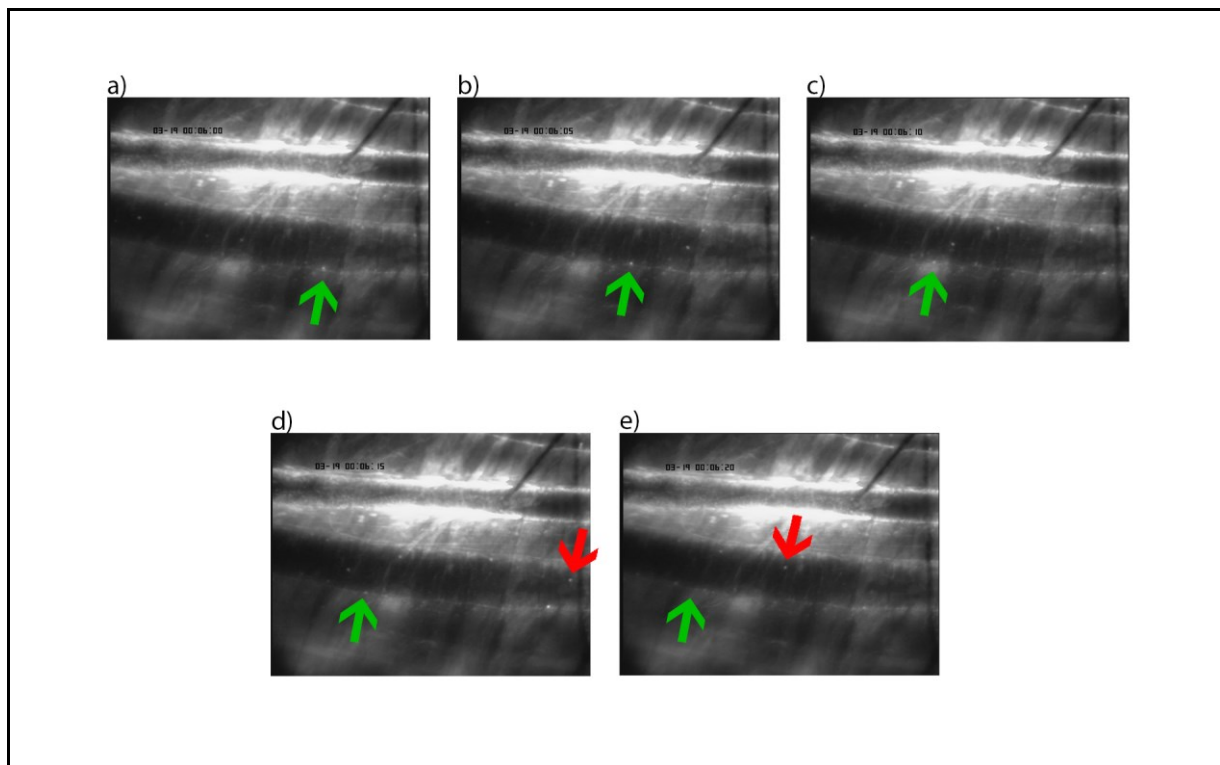


Abb. 5: a-e) Vergleichende Darstellung einer CFDA-markierten, rollenden c-kit⁺-Stammzelle (grüner Pfeil) mit einer nicht mit dem Endothel interagierenden Stammzelle (roter Pfeil) in fünfsekündigen Aufnahmeabständen (Aufnahmen unter Verwendung eines 20x/0,45 Olympus LUC Plan FLN-Wasserimmersionsobjektives und einer Pieper FK 6990A-IQ-Videokamera)

Nach Durchführung der fünf das Rolling betreffenden Aufnahmezyklen werden die primär ausgewählten postkapillären Venolen aufgesucht und weitere fünf Aufnahme über jeweils 60 Sekunden durchgeführt, um die Menge adhärenter Stammzellen erfassen zu können.

Während sämtlicher Aufnahmen ist ein besonderes Augenmerk auf die Narkose des Versuchstieres zu legen. Eine nachlassende Narkosetiefe führt zu Tachykardie sowie Hypertonie. Abgesehen vom dem zu vermeidenden erhöhten Stresslevel für das Versuchstier führt der beschleunigte und härtere Pulsschlag durch die Erschütterungen des M.cremaster zu massiv verschlechterten Aufnahmebedingungen.

Nach Abschluss der Aufnahmen wurde der M.cremaster mit einer Schere vom Versuchstier getrennt, in einem 1,5ml Mikrotube gelagert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Muskels bis zur immunhistochemischen Untersuchung erfolgte bei -80°C.

Nach Abschluss des Experimentes erfolgte die Tötung des Versuchstieres durch zervikale Dislokation.

2.5 Digitale Auswertung

Die digitale Auswertung der angefertigten Aufnahmen erfolgte mit einem Wiedergabegerät (Panasonic LQ-MD800), welches eine reduzierte Abspielgeschwindigkeit der Videodateien

ermöglicht und der Software CapImage 8.5. Die verlangsamte Wiedergabe ermöglichte das Erkennen aller einen bestimmten Gefäßabschnitt passierenden Stammzellen und erleichterte die Unterscheidung zwischen Stammzellen und ebenfalls zirkulierenden Leukozyten. Die verwendete CapImage-Software bot die Möglichkeit zur Erfassung diverser hämodynamischer Parameter wie Blutflussgeschwindigkeit (in mm/s), Länge des betrachteten Gefäßabschnittes (in μm) und Gefäßdurchmesser des betrachteten Gefäßabschnittes (in μm).

Zur Vergleichbarkeit der Mengen der Stammzellen bei denen Rolling auftrat, wurde das Verhältnis zwischen den in 60 Sekunden Beobachtungszeit gezählten Stammzellen mit Rolling-Phänomen zu allen in den selben 60 Sekunden den selben Gefäßabschnitt passierenden Stammzellen gebildet. Rolling wurde dabei als eine im Vergleich zur restlichen Zellpopulation um mindestens 50% verminderte Bewegungsgeschwindigkeit und das Auftreten von typischen Bewegungsmustern, welche wiederholtes kurzes Hängenbleiben an der Gefäßwand mit folgender Loslösung beinhaltet, definiert. Sich kürzeste Zeit an die Gefäßwand anheftende Stammzellen, welche sich anschließend wieder mit höherer Geschwindigkeit fortbewegten, wurden nicht als rollend gezählt. Die Angabe der rollenden Stammzellen erfolgte in Prozent der Gesamtmenge der passierenden Stammzellen.

Die Angabe der adhärenen Stammzellen erfolgte in Verhältnis zur ausgemessenen Oberfläche der untersuchten Gefäßabschnitte. Als adhären galt eine Stammzelle, wenn 30 Sekunden keinerlei Zellbewegung bei gleichzeitig vorhandenem Blutfluss erkennbar war. Der Beobachtungszeitraum der Venolen betrug jeweils 60 Sekunden.

2.6 Auswertung und Statistik

Die digitale Auswertung von Rolling und Adhäsion erfolgte durch den Untersucher in Hinblick auf die Zugehörigkeit der Versuchstiere zu den jeweiligen Versuchsgruppen unverblindet.

Alle Ergebnisse wurden unter Anwendung des Shapiro-Wilk-Testes auf Normalverteilung getestet. Weiterhin wurden für die Zielvariablen Rolling und Adhäsion jeweils eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse gefolgt von der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn für nicht verbundene Stichproben, durchgeführt.

Für alle Versuchsgruppen wurden die Ergebnisse mit Mittelwert, Standardabweichung, Median und Interquartil-Abständen (25%-75%) angegeben.

Für die statistische Auswertung und Darstellung wurde das Programm SigmaPlot 11 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines *in vivo*-Modells zur Analyse Ischämie-Reperfusions-Prozess-bedingter Veränderungen am Musculus cremaster

Teilzielstellung dieser Arbeit war die Etablierung eines *in-vivo*-Modells zur Analyse Ischämie-Reperfusions-bedingter Veränderungen des Migrationsverhaltens von c-kit⁺-Stammzellen. Zu diesem Zweck gelang die Modifikation des von Donndorf et al. beschriebenen Leitfadens zur intravitalmikroskopischen Beobachtungen der Mikrozirkulation des murinen M. cremaster zur Analyse peripherer Stammzellmigration [68]. Die Verwendung der neurochirurgischen Aesculap FT 250T-Klemme ermöglichte eine reproduzierbare und kontrollierbare Ischämie des M. cremaster. Die Entfernung der Klemme erlaubt eine spontane Reperfusion des Muskelgewebes. Die durch die einfache Mechanik bedingte Kontrollierbarkeit dieses Verfahrens ermöglichte ein Versuchsdesign mit mehreren, sich in exakt determinierter Ischämie- und Reperfusionszeit unterscheidenden Versuchsgruppen.

3.2 Gruppengröße / Ausschlusskriterien

Kriterium für den Ausschluss einer Aufnahme war ein Erliegen des systemischen oder des im Beobachtungsgebiet lokalisierten Blutflusses während des Beobachtungszeitraumes. Ein Versterben des Versuchstieres während eines Aufnahmezyklus führte jedoch nicht zum Ausschluss bereits am selben Tier abgeschlossener Aufnahmen. Ebenso wenig war eine lokale Durchblutungsstörung ein Ausschlusskriterium, wenn sich im selben M. cremaster noch ein Gebiet mit regulärer Zirkulation auffinden ließ. Es ergaben sich folgende Gruppengrößen zur Auswertung wobei n der Anzahl der auswertbaren Aufnahmen entspricht:

Beobachtung des Rolling

1.) Kontrollgruppe	Ischämie/Reperfusion 00/00min n=36
2.) Versuchsgruppe 1	Ischämie/Reperfusion 15/15min n=39
3.) Versuchsgruppe 2	Ischämie/Reperfusion 30/15min n=30

Beobachtung der Adhäsion

1.) Kontrollgruppe	Ischämie/Reperfusion 00/00min n=36
2.) Versuchsgruppe 1	Ischämie/Reperfusion 15/15min n=39
3.) Versuchsgruppe 2	Ischämie/Reperfusion 30/15min n=30

Tab. 1: Gruppengrößen nach Ausschluss nicht geeigneter Aufnahmen**3.3 Blutflussgeschwindigkeit**

	Kontrollgruppe	IR 15-15	IR 30-15
Gruppengröße	36	39	30
Mittelwert (in mm/s)	0,630	0,576	0,733
Standardabweichung (in mm/s)	0,522	0,483	0,527
Range (in mm/s)	2,155	2,597	2,327
Maximum (in mm/s)	2,251	2,734	2,518
Minimum (in mm/s)	0,096	0,137	0,191
Median (in mm/s)	0,422	0,435	0,581
Q 25% (in mm/s)	0,243	0,274	0,332
Q 75% (in mm/s)	1,047	0,715	0,900

Tab. 2: Deskriptive Statistik der Blutflussgeschwindigkeiten

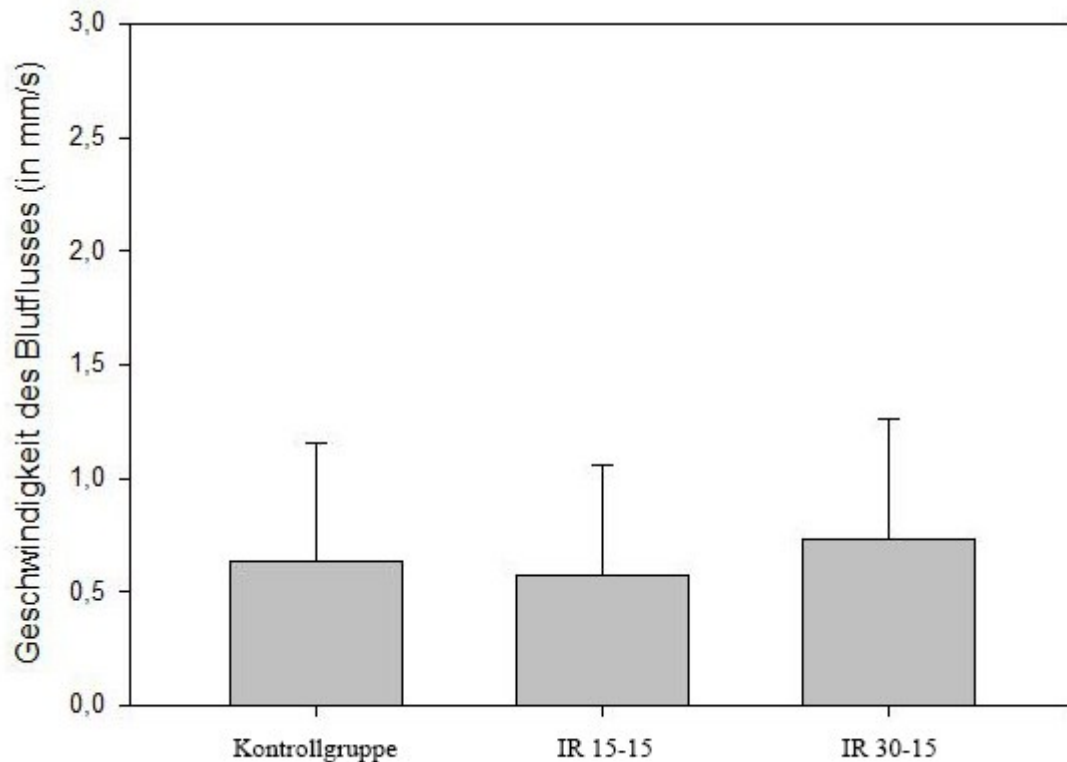


Abb. 6: Vergleich der, durch IVM beobachteten, Blutflussgeschwindigkeiten in den postkapillären Venolen

Nach Ausschluss der Venolen in denen keine Zirkulation mehr vorhanden war, überprüften wir die Blutflussgeschwindigkeit in den verbleibenden Gefäßen der Gruppen unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Testes auf Normalverteilung, welche nicht vorlag ($P < 0,05$). Aufgrund der fehlenden Normalverteilung schloss sich eine univariate Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis an. Diese ergab mit einem H-Wert von 3,121 bei zwei Freiheitsgraden eine Bestätigung der Nullhypothese nach der kein die Blutflussgeschwindigkeit betreffender, signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen besteht ($P = 0,210$).

3.4 Rolling der c-kit⁺-Stammzellen

	Kontrollgruppe	IR 15-15	IR 30-15
Gruppengröße	36	39	30
Mittelwert	17,298	32,175	34,125
Standardabweichung	3,952	10,843	11,355
Range	14,821	42,333	44,156
Maximum	23,81	58,333	63,636
Minimum	8,989	16,000	19,481
Median	17,270	29,268	33,150
Q 25%	14,528	23,683	24,138
Q 75%	20,256	39,380	40,000

Tab. 3: Deskriptive Statistik des beobachteten Rolling von c-kit⁺-Stammzellen

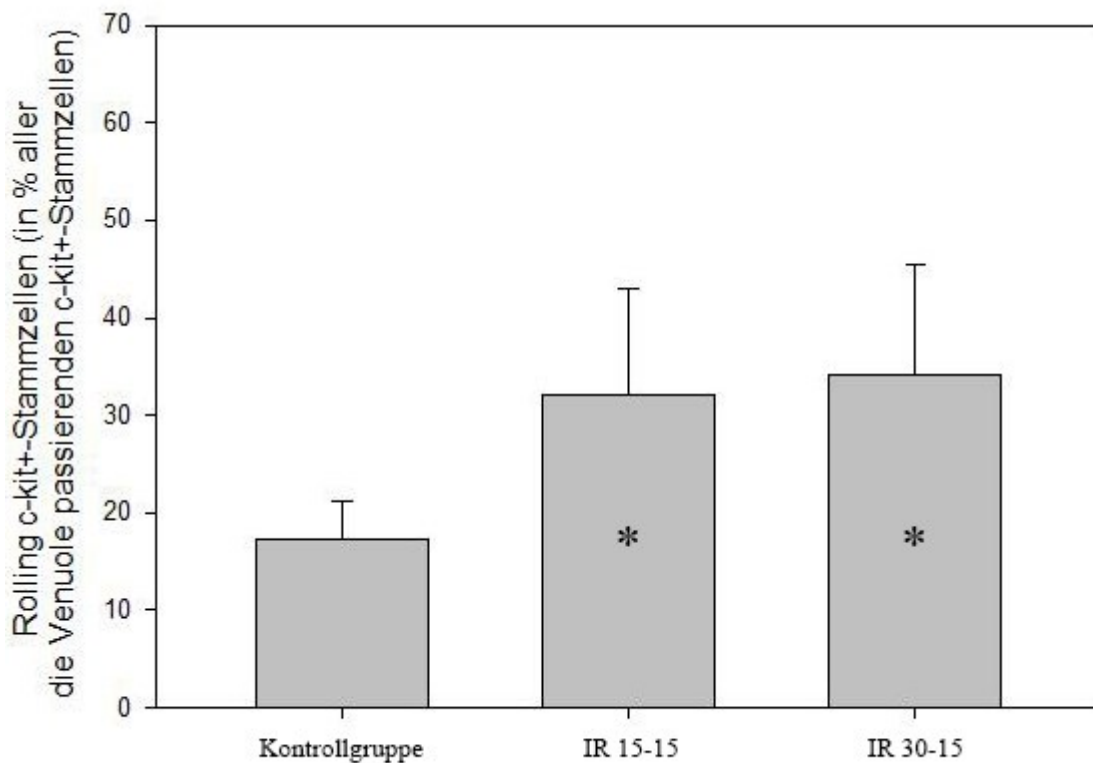


Abb. 7: Vergleich des, durch IVM beobachteten, Anteils der Rolling zeigenden c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen in den postkapillären Venolen
(* bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe)

In allen Versuchsgruppen ließ sich das Phänomen des Rolling der fluoreszenzmarkierten c-kit⁺-Stammzellen in jeder der willkürlich gewählten postkapillären Venolen beobachten. In beiden IR-Versuchsgruppen zeigt sich eine deutliche Zunahme des Mittelwertes der Rolling-c-kit⁺-Stammzellfraktion (IR 15-15: 32,175±10,843; IR 30-15: 34,125±11,355) um mehr als 85% im Vergleich mit der Kontrollgruppe (17,298±3,952). Der zur Überprüfung einer Normalverteilung angewandte Shapiro-Wilk-Test ergab eine fehlende Normalverteilung der Ergebnisse (P<0,05). Die anschließend durchgeführte univariate Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis erlaubte mit einem H-Wert von 55,954 bei zwei Freiheitsgraden ein Verwerfen der Nullhypothese und damit die Aussage über einen durch die Einflussvariable Ischämiedauer hervorgerufenen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Um zu spezifizieren zwischen welchen Versuchsgruppen sich diese Unterschiede zeigten wandten wir die „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn für nicht verbundene Stichproben an.

„All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn			
Vergleichspaarung	Rangdifferenz	Q	P<0,05
IR 30-15 vs. Control	49,317	6,551	Ja
IR 30-15 vs. IR 15-15	4,688	0,634	Nein
IR 15-15 vs. Control	44,628	6,340	Ja

Tab. 4: Ergebnisse der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ das Rolling von c-kit⁺-Stammzellen betreffend

Dunns Methode zeigte einen signifikanten Unterschied (P<0,05) der beiden Ischämie-Reperfusion-Versuchsgruppen zu der Kontrollgruppe. Zwischen den 15-minütiger und den 30-minütiger Ischämie ausgesetzten Versuchstieren ergab sich hingegen keine signifikante Varianz.

3.5 Adhärenz der c-kit⁺-Stammzellen

	Kontrollgruppe	IR 15-15	IR 30-15
Gruppengröße	39	36	30
Mittelwert in (n/mm²)	14,53	32,92	14,63
Standardabweichung in (n/mm²)	12,53	32,05	11,84
Range in (n/mm²)	39,55	150,76	48,74
Maximum in (n/mm²)	39,55	150,76	48,74
Minimum in (n/mm²)	0,00	0,00	0,00
Median in (n/mm²)	12,74	23,53	14,26
Q 25% in (n/mm²)	0,73	11,91	4,43
Q 75% in (n/mm²)	23,94	38,61	22,46

Tab. 5: Deskriptive Statistik der beobachteten Adhäsion von c-kit⁺-Stammzellen

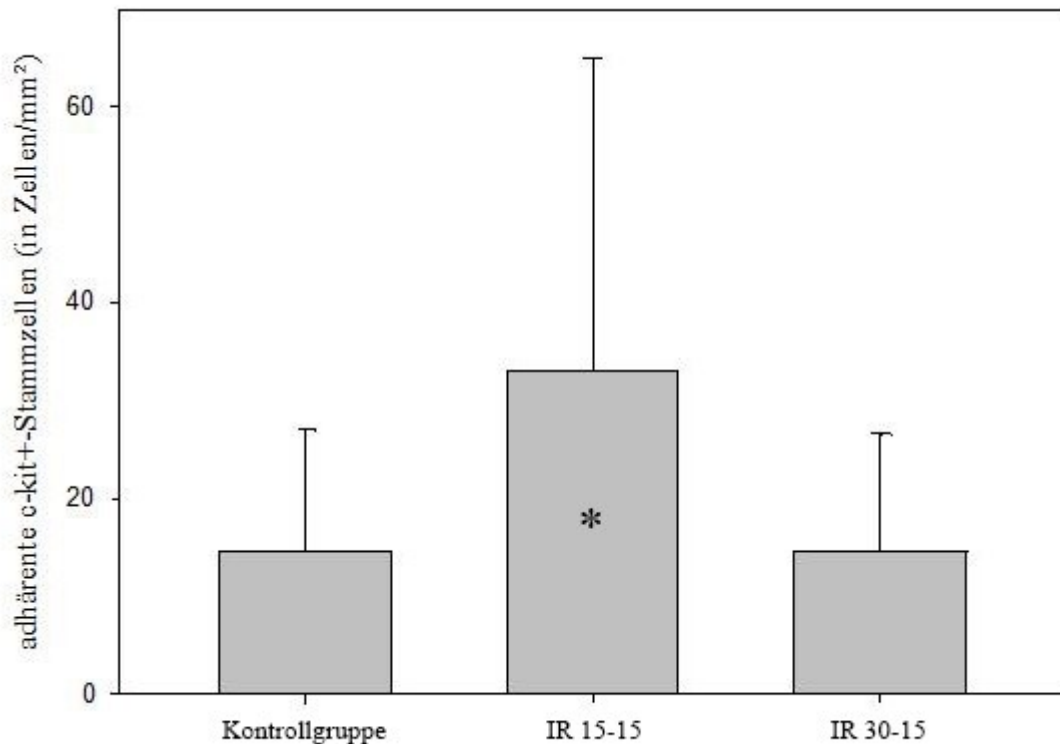


Abb. 8: Vergleich der, durch IVM beobachteten, adhärenen c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen pro mm² Gefäßwandoberfläche der postkapillären Venolen

(* bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe)

Bei der Betrachtung der die Adhärenz der c-kit⁺-Stammzellen betreffenden Ergebnisse fallen zunächst die postkapillären Venolen auf, bei deren Beobachtung keine adhärenen Zellen aufgezeichnet wurden. In der Kontrollgruppe betrifft dies 25,64% aller beobachteten Venolen, in der IR 15-15-Versuchsgruppe 8,33% und in der IR 30-15-Versuchsgruppe 16,67%. Der Vergleich der Mittelwerte der adhärenen Stammzellen pro Oberfläche der Gefäßwand zeigt in der IR 15-15-Versuchsgruppe ($32,92 \pm 32,05$) eine deutliche Zunahme der Adhärenz um 126,57% gegenüber der Kontrollgruppe ($14,53 \pm 12,53$). In der IR 30-15-Versuchsgruppe ($14,63 \pm 11,84$) zeigt sich hingegen wieder eine Abnahme der Adhärenz. Der Mittelwert der adhärenen Stammzellen liegt hier 0,68% über dem der Kontrollgruppe. Die Betrachtung der Mediane zeigt eine ähnliche Tendenz mit einer 84,69-prozentigen Zunahme in der IR 15-15-Versuchsgruppe (23,53) und einer 11,93-prozentigen Zunahme in der IR 30-15-Versuchsgruppe (14,26) gegenüber der Kontrollgruppe (12,74).

Der Shapiro-Wilk-Test ergab auch für die Adhärenz der c-kit⁺-Stammzellen eine fehlende Normalverteilung ($P < 0,05$). Es schloss sich erneut eine univariate Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis an, welche mit einem H-Wert von 11,111 bei zwei Freiheitsgraden erneut erlaubte, die Nullhypothese zu verwerfen. Es ergab sich ein auf die Ischämiedauer zurückführbarer sehr

signifikanter Unterschied ($P=0,004$) zwischen den Versuchsgruppen. Zur Identifizierung der sich unterscheidenden Gruppen wandten wir erneut die „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn für nicht verbundene Stichproben an.

„All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn			
Vergleichspaarung	Rangdifferenz	Q	P<0,05
Control vs. IR 30-15	0,140	0,0189	Nein
IR 15-15 vs. IR 30-15	20,897	2,776	Ja
IR 15-15 vs. Control	20,757	2,949	Ja

Tab. 6: Ergebnisse der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ die Adhäsion von c-kit⁺-Stammzellen betreffend

Es zeigte sich für die IR 15-15-Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied ($P<0,05$) sowohl zu der Kontrollgruppe als auch zu der IR 30-15-Versuchsgruppe. Ein Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der IR 30-15-Versuchsgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied.

4. Diskussion

4.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit durchgeführte Grundlagenforschung der Stammzelltherapie dient dem Erkenntnisgewinn über verändertes Verhalten von Stammzellen in einem, durch Ischämie veränderten, vaskulären System. Kardiovaskuläre Ischämie stellt eine jener Pathologien dar, für deren Behandlung ein Benefit durch Stammzelltherapie erhofft wird. Aufgrund der noch nicht vollständig erschlossenen, durch die Ischämie ausgelösten Veränderungen im nachgeschalteten Gefäßsystem wie z.B. Schädigung der Endothelzellen, veränderte Rezeptorexpression oder veränderte Hämodynamik sind ausschließlich tierexperimentelle Untersuchungen geeignet, eine unverfälschte Versuchsumgebung zu bieten, da es derzeit nicht möglich ist, die komplexen Alterationen durch künstlich geschaffene Systeme wie Zellkulturen oder Computermodelle vollständig zu simulieren.

Kleintiermodelle mit Mäusen und Ratten sind ebenso wie die Verwendung von Großtieren wie Schweinen und Hunden im Rahmen der Stammzellforschung fest etabliert. Aufgrund der kosten- und platzgünstigen Haltung und des schnellen Vermehrungszyklus von Mäusen wurde für diese Arbeit ein Kleintiermodell bevorzugt. Im Gegensatz zu Ratten ist es bei Mäusen möglich, zahlreiche genetische Varianten zu züchten. Auch wenn in dieser Arbeit ausschließlich WT-C57BL/6J-Tiere verwendet wurden, so ist eine Fortführung der Versuche mit knockout-Mäusen durchaus denkbar. Weiterhin sind bereits erprobte Antikörper, wie die hier zur Isolation der c-kit⁺-Stammzelllinie aus dem Spenderknochenmark verwendeten, kommerziell erhältlich.

Mäuse und Menschen weisen ein in Aufbau und Funktion sehr ähnliches kardiovaskuläres System auf. Beide Spezies besitzen ein aus Vorhöfen und Kammern bestehendes vierkammeriges Herz. Der mittlere arterielle Blutdruck liegt bei einer anästhetisierten Maus zwischen 70mmHg und 90mmHg. Ein Unterschied zwischen den kardiovaskulären Systemen beider Spezies findet sich bei der Herzfrequenz in Ruhe, welche bei einer Maus mit 500-600 Schlägen pro Minute deutlich die bei 60-70 Schlägen pro Minute liegenden Frequenz eines Menschen übertrifft [69].

4.1.1 Größe, Alter, Gewicht

Das Mindestalter der verwendeten C57BL/6J-Tiere lag bei 8 Wochen. In diesem Alter haben die Tiere das für die Präparation notwendige Minimalgewicht von 20g erreicht. Bei leichteren Jungtieren ist von einer geringeren Körpergröße auszugehen, welche sich negativ auf die Erfolgsaussichten der Präparation auswirkt. Insbesondere die Katheterisierung der A. femoralis ist aufgrund des geringeren Gefäßdurchmessers erschwert. Eine Penetration der Gefäßwand mit

der Katheterspitze führt in fast allen Fällen aufgrund des Blutverlustes zum Versterben des Versuchstieres. Das Idealgewicht für die Präparation liegt bei 20-25g. Schwerere Tiere weisen vermehrtes Fettgewebe in der Inguinalregion auf. Dieses muss bei der Freilegung der A. femoralis und des M. cremaster entfernt werden, um adäquate Sicht auf diese Strukturen zu gewährleisten.

4.1.2 Versuchsgruppen

Die Verteilung der Versuchstiere auf die Versuchsgruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Intention dahinter lag in der Annahme auf diese Weise den Einfluss von Zufallsgrößen wie Alter, Begleiterkrankungen und Ernährungszustand begrenzen zu können. Dieser Einfluss wurde weiterhin durch die Verwendung junger Tiere, welche ein vitales Verhalten zeigten, sowie deren Ernährung mit standardisiertem Futter minimiert.

Ein Einfluss des Geschlechtes auf die Ergebnisse kann aufgrund des auf den M. cremaster angewiesenen und damit auf eine rein männliche Versuchspopulation begrenzten Designs des Experimentes ausgeschlossen werden.

4.1.3 Spendertiere

Auch bei den Spendertieren wurden ausschließlich vitale männliche Jungtiere verwendet. Die für die Entnahme des tibialen und femoralen Knochenmarks genutzten C57BL/6J-Tiere waren ebenfalls mindestens 8 Wochen alt. Anforderungen das Körpergewicht betreffend lagen an die Spendertiere nicht vor. Ihre Unterbringung und Ernährung war mit denen der Versuchstiere identisch. Die Kombination männlicher Spender mit männlichen Empfängertieren stellt, nach einer die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie mit allogenen Stammzellen untersuchende Studie, bezüglich Migration und Überleben der eingesetzten Stammzellen sowie dem Auftreten von Graft-versus-Host-Reaktionen die bevorzugte Variante gegenüber der Verwendung Spender-Empfänger-Paarungen mit unterschiedlichem Geschlecht dar [70]. Aufgrund fehlender Darstellungen von Nachteilen dieser Kombination in der aktuellen Literatur wurden trotz des sich deutlich unterscheidenden Anwendungsgebietes in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls männliche Spendertiere gewählt.

4.2 Aufbau des Experimentes

4.2.1 Stammzellisolation

Mit der Magnetic Cell Separation steht ein bewährtes Verfahren zur Extraktion von bestimmten Zellfraktionen aus dem Knochenmark der Spendertiere zur Verfügung. Die Bindung

superparamagnetischer Mikropartikel an Antikörper ermöglicht die Markierung von Zellen anhand von für die jeweilige Zelllinie spezifischer Oberflächenproteine innerhalb einer heterogenen Zellsuspension. Diese Suspension kann anschließend durch ein ferromagnetisches System mit hohen Magnetfeldgradienten geleitet werden. Ausschließlich die markierten Zellen werden durch die Ferromagneten zurückgehalten. Eine anschließende Auswaschung der Zellen kann problemlos nach Entfernung des Ferromagneten erfolgen. Eine Interferenz zwischen superparamagnetischer Markierung und Fluoreszenzfärbung konnte bisher nicht beobachtet werden. Ebenso wenig liegt eine Beeinflussung der Lichtbrechung und fluoreszierender Eigenschaften durch die Mikropartikel vor. Auch scheint die Zellvitalität durch Markierungs- und Trennverfahren nicht negativ beeinflusst zu werden [71].

Daher erscheint diese Isolationsmethode für die Anwendung im Rahmen eines intravitalmikroskopischen Experimentes, welches auf funktionierende Zellinteraktionen und eine gute Detektierbarkeit durch Fluoreszenzmarkierung angewiesen ist, gut geeignet zu sein.

4.2.2 Anästhesie

Die initiale Anästhesie der Versuchstiere erfolgte mit in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem 75mg/kg Ketamin und 2,5mg/kg Xylazin i.p. Die Kombination dieser beiden Anästhetika ist bei der Anästhesie von Labormäusen weit verbreitet. Ein Einfluss auf die Migration von Stammzellen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, was diese Art der Anästhesie für das hier durchgeführte Experiment besonders geeignet erscheinen lässt.

Bei Bedarf wurde die für die Präparation erforderliche Tiefe der Narkose mit einer weiteren i.p. Injektion von 10% der initialen Ketamindosis aufrechterhalten. Als Symptom einer nachlassenden Narkosetiefe galten dabei eine Erhöhung der Puls- und Atemfrequenz sowie eine Rückkehr des Rückziehreflexes der rechten Hinterpfote auf einen taktilen Reiz. Die linke Hinterpfote war für diesen Test aufgrund der während der Präparation gesetzten Nervenläsionen ungeeignet. Die Dosis der Nachinjektion lag damit deutlich unter der von Jaber et al. empfohlenen Menge. In der 2014 publizierte Studie postulierten sie zur Minimierung der perioperativen Mortalität sowie der bestmöglichen Verlängerung des Operationszeitraumes die Nachinjektion von 50% der initialen Ketamindosis oder 25% der initialen Ketamin/Xylazin-Dosis direkt bei Wiederauftreten des Rückziehreflexes [72]. Jedoch wurde bei den im Reference and Translation Centre for Cardiac Stem Cell Therapy Rostock durchgeführten Versuchen die auch in dieser Arbeit verwendete Dosierung als ausreichend für eine 30- bis 60-minütige Verlängerung der Anästhesiedauer befunden [68], während eine darüber hinaus gehende Menge zu einem Versterben der Tiere aufgrund einer zu starken vegetativen Dämpfung führte.

4.2.3 Präparation

Die Präparation des M. cremaster mit Eröffnung und Aufspannen des Muskelsackes wurde zuerst 1973 von Baez et al. an Ratten durchgeführt. Die geringe Dicke des Gewebes erlaubte eine *in toto* Durchleuchtung und damit die Darstellung des vollständigen arteriellen und venösen Gefäßsystems des M. cremaster bis zu den terminalen Aufzweigungen [73]. Bereits früher wurden Präparationen eines geschlossenen M. cremaster für die Intravitalmikroskopie durchgeführt [74], welche jedoch durch den gebogenen Verlauf des Muskels und den Verlauf der Gefäße in unterschiedlichen Ebenen des Gewebes zu Schwierigkeiten mit der Einstellung einer scharfen Bildebene führten [75]. Baez et al. postulierten weiterhin, dass durch eine Zugkraft von $<1,77\text{N}$ zum Aufspannen des Muskelsackes keinerlei Veränderungen in Durchmesser oder Reaktivität der präkapillären Gefäße oder im kapillären Blutfluss im Vergleich zum ungeöffneten M. cremaster hervorrufe [73].

Die für Ratten entwickelte Präparationsmethode konnte erfolgreich auf Hamster und Mäuse übertragen werden [76]. Während der M. cremaster von Ratten und Hamstern sich zum Studium der Physiologie der Mikrozirkulation eignet, ist er besonders bei Mäusen zur Beobachtung zellulärer, die mikrovaskuläre Funktion regulierender Signalwege und der Erstellung von Echtzeitaufnahmen interzellulärer Kommunikation geeignet [77]. Nachdem der Fokus der meisten vorangegangenen, diese Präparation des M. cremaster nutzenden Publikationen auf der Interaktion von Leukozyten mit der Gefäßwand lag, veröffentlichte unsere Arbeitsgruppe eine Reihe von Arbeiten, welche dieses Model zur Beobachtung der Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und Gefäßendothel etablierten, wobei diverse Stammzellsubpopulationen wie humane CD-133⁺-Knochenmarkstammzellen [67], murine mesenchymale Stammzellen [78] oder, wie in der hier vorliegenden Arbeit, murine c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen [36, 38] verwendet wurden.

Die Besonderheit der hier genutzten Präparationsmethodik besteht in der arteriellen Applikation der Stammzellen in die A. femoralis via Mikrokatheter. Diese bietet im Gegensatz zur venösen Injektion den Vorteil einer direkteren Route der applizierten Stammzellen in das Zielgewebe ohne einen Zellverlust in vorgeschalteten Organkreisläufen. Gleichzeitig besteht in der Insertion des Mikrokatheters jedoch auch ein kritisch zu betrachtender Teil der Präparation. Die Thrombogenität arterieller Katheter steht seit den 1970er Jahren im Fokus der Forschung [79]. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Verfahren, wie systemische Heparinisierung, eine Heparinbeschichtung der Katheter und die Herstellung neuer Kathetermaterialien entwickelt, um diese Thrombogenität zu reduzieren. Um jedoch die Ergebnisse unserer Untersuchung nicht zu verfälschen, wurde für diese Arbeit auf diese Methoden verzichtet. Stattdessen erfolgte eine

regelmäßige Aspiration und Spülung des Mikrokatheters mit physiologischer NaCl-Lösung um die Stase des Blutflusses zu unterbrechen und damit der Thrombusbildung entgegenzuwirken. Trotz dieses Verfahrens kam es wiederholt zu einer Obstruktion des Katheters. Ein Austausch des Katheters ist mit größeren Blutverlusten verbunden und reduziert über die Dauer des Experimentes die Überlebenswahrscheinlichkeit des Versuchstieres. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen der hiesigen Arbeitsgruppe lässt sich generell eine Ausfallquote von 20-30% der Versuchstiere, entweder aufgrund intraoperativen Versterbens oder Stagnation der Mikrozirkulation des M. cremaster, erwarten. Da sich in den Experimenten unserer Arbeitsgruppe keine Obduktion der Versuchstiere anschloss, lassen sich keine exakten Ursachen dieser Ereignisse benennen. Jedoch stellt eine auf versprengtes thrombotisches Material zurückzuführende Genese eine denkbare Erklärung dar. Um die Anzahl solcher Ereignisse in zukünftigen Experimenten, beispielsweise für eine weitere Spezifizierung der durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufene Modulation der Stammzellmigration, welche vermutlich eine verlängerte Ischämie- und Reperusionszeiten erfordern würde, zu reduzieren, wäre die Anwendung einer der vorhandenen antithrombogenen Methoden möglich. Der Grundgedanke hinter der hier vorliegenden Grundlagenforschung liegt in einer verbesserten Durchführung der kardialen Stammzelltherapie. Daher bietet eine Betrachtung der Standardmedikation der Patienten während dieser Therapie eine Möglichkeit zur Modifikation des Experimentes. So gehört bei CABG aufgrund des Einsatzes einer Herz-Lungen-Maschine die Heparinisierung der Patienten zum Standardvorgehen. Es lässt sich argumentieren, dass mit dem Einsatz einer systemischen Heparinisierung der Versuchstiere eine Beeinflussung der Ergebnisse zwar nicht ausgeschlossen werden kann, jedoch im letztlichen Anwendungsgebiet eine hochgradig ähnliche Beeinflussung besteht.

Als weiteren zu einer möglichen Verfälschung der Versuchsergebnisse führenden Punkt muss das durch die Präparation selbst hervorgerufene Trauma des M. cremaster genannt werden. Die Eröffnung des Muskelsackes sowie die Manipulation des umliegenden Weichteilgewebes führt zu Veränderungen des Blutflusses [80] und einer gesteigerten Leukozytenaktivierung. Ein Einfluss auf die Migration der Knochenmarkstammzellen ist ebenfalls nicht auszuschließen. Durch eine regelmäßige Befeuchtung des Gewebes sowie eine postoperative Ruheperiode können diese Effekte reduziert werden [81]. Weiterhin sind eine ausreichende Anzahl an Übungspräparationen zum Erlernen der sicheren Durchführung der Präparation vor Beginn des tatsächlichen Versuches und ein möglichst atraumatisches intraoperatives Vorgehen zur Schonung des Gewebes und damit zur Minimierung dieser Alterationen zwingend erforderlich. Trotz Beachtung dieser Punkte wurde eine, wahrscheinlich durch unterschiedlich starke

Aktivierung des Gewebes hervorgerufene, leichte Abweichung zwischen Ergebnissen verschiedener Operateure beobachtet [68]. Daher sollten, wie auch im Rahmen dieser Arbeit erfolgt, sämtliche Präparationen eines Experimentes durch einen einzigen Operateur durchgeführt werden.

4.2.4 Ischämie und Reperfusion

Zur kontrollierten, zeitlich begrenzten Schaffung eines ischämischen Milieus im M. cremaster wurde der Blutfluss in den Rr. scrotales der A. pudenda interna und der V. scrotalis posterior mit einer neurochirurgischen Aesculap FT 250T-Klemme unterbrochen. Die ursprünglich für das Clipping von Aneurysmen entwickelte Klemme schließt mit einer Kraft von 0,88N. Die Länge der "Blades" von 9mm erlaubt ein Abklemmen der gesamten körpernahen Basis des M. cremaster und verhindert damit sicher die Sauerstoffversorgung über die Hauptversorgungsbahn und eventuell vorhandene Kollateralkreisläufe. Obwohl bei der Aneurysmaversorgung mit neurochirurgische Klemmen ein Auftreten von segmentalen Gefäßwandnekrosen beschrieben wurde [82], erscheint die Anwendung aufgrund der stark begrenzten Anwendungszeit und der einfachen Entfernung der Klemme nach Ablauf dieser geplanten Ischämiezeit empfehlenswert.

Als problematisch ist das vollständige Erliegen des Blutflusses im Muskelgewebe zu betrachten. Als Teil der Virchow-Trias handelt es sich um einen prothrombotischen Vorgang. Da sich jedoch keine kontrollierte Ischämie ohne Unterbrechung des Blutflusses induzieren lässt, ist dieser Faktor derzeit nicht zu vermeiden.

4.2.5 Intravitalmikroskopie

Bei der Betrachtung der Mikrozirkulation *in vivo* via Intravitalmikroskopie handelt es sich um ein etabliertes Konzept. Die erste gesicherte Anwendung der Intravitalmikroskopie durch Julius Cohnheim fand bereits im 19. Jahrhundert statt. Diese diente der Beobachtung von Leukozytenmigration in traumatisiertem Gewebe. Cohnheim verwendete dabei ein Lichtmikroskop und die Zunge und das Mesenterium von Fröschen [83].

Seit dieser Zeit konnte die Technik der Intravitalmikroskopie für diverse Spezies und Gewebe, wie z.B. die Ohren von Kaninchen [84], Wangentaschen von Hamstern [85], die Flügel der Fledermaus [86] oder Leber [87], Mesenterium [88] und Cremastermuskulatur [74] von Mäusen und Ratten, übertragen und weiterentwickelt werden. Die Optimierung der Gewebepreparation erlaubt dabei den visuellen Zugang zu vorher nicht einsehbaren Geweben bei gleichzeitiger Minimierung der perioperativ zugefügten Traumata.

Weiterhin stehen mit der Entwicklung von molekularen, mikroskopisch detektierbaren Sonden

wie z.B. antikörpergekoppelten fluoreszierenden Farbstoffen, sowie der Möglichkeit zur digitalen Aufzeichnung der mikroskopisch beobachteten Vorgänge und Software zur computergestützten Analyse dieser Aufzeichnungen [68] die Mittel für eine standardisierte und an die für die jeweilige Studie relevante Zielstruktur anpassbare Durchführung der Intravitalmikroskopie zur Verfügung.

Die Intravitalmikroskopie stellt damit eine praktikable Methode zur Beobachtung von pathologischen und physiologischen Vorgängen auf mikrovaskulärer Ebene *in vivo* dar.

4.2.6 Digitale Auswertung

Bei dem hier vorliegenden Experiment handelt es sich um eine prospektive, randomisierte, kontrollierte, "nicht-verblindete" Studie. Dabei stellt die "nicht-verblindete" Auswertung der erhobenen Daten einen potentiellen systematischen Fehler dar. Für zukünftige Experimente empfiehlt es sich daher das Studiendesign entsprechend zu modifizieren. Da eine Verblindung zum Zeitpunkt der Präparation und der Aufnahmen für den Operateur nicht möglich ist, verbleibt die Übernahme der Auswertung bei einem weiteren Mitglied der jeweiligen Arbeitsgruppe.

Mit der CapImage-Software steht ein Werkzeug zur Verfügung, welches eine differenzierte Auswertung der erstellten Aufnahmen erlaubt. Sowohl die Erfassung hämodynamischer Parameter wie Blutflussgeschwindigkeit und Scherspannung an den Gefäßwänden als auch statischer Größen wie Gefäßdurchmesser oder -oberfläche zur Beurteilung der Mikrozirkulation sind möglich. Die Verringerung der Abspielgeschwindigkeiten auf einen Bruchteil des ursprünglichen Aufnahmetempos ermöglicht die Beurteilung intravasaler Vorgänge, wie beispielsweise die Zählung aller fluoreszenzmakierter Zellen, die ein Gefäß passieren, mit dem menschlichen Auge. Ein weiterer Vorteil liegt in der Adaptierbarkeit von Bildschärfe und Kontrast, womit sich die Qualität der angefertigten Aufnahmen verbessern lässt.

4.2.7 Etablierung eines *in vivo*-Modells zur Analyse Ischämie-Reperfusions-Prozessbedingter Veränderungen am Musculus cremaster

Durch die Verwendung der bereits ausgiebig bezüglich Reproduzierbarkeit getesteten Anleitung zur Präparation eines murinen M. cremaster und der anschließenden intravitalmikroskopischen Analyse von Stammzellmigration in dessen Mikrozirkulation bedurfte es, um den Anforderungen der hier vorliegenden Studie zu entsprechen, einzig einer Modifikation zum kontrollierten Auslösen einer Ischämie im M. cremaster. Dies ließ sich durch die externe mechanische Obstruktion des Blutflusses durch eine Aesculap FT 250T-Klemme realisieren. Die Reversibilität

der Obstruktion ermöglicht die zeitlich abgestimmte Reperfusion. Gleichzeitig erfordert diese Methodik keine zusätzlichen invasiven Eingriffe in das Gefäßsystem des Versuchstieres wie sie beispielsweise die Insertion eines Ballonkatheters benötigen würde. Dies minimiert die Wahrscheinlichkeit zusätzlicher präparationsbedingter, im M. cremaster lokalisierter oder systemischer Effekte, welche als systematischer Fehler im Versuchsaufbau zu betrachten wären. Da somit die einzige Veränderung des hier durchgeführten Experimentes im Vergleich zum etablierten Modell von Donndorf et al. in der gewünschten Ergänzung einer steuerbaren ischämischen Phase im M. cremaster besteht, ist das Versuchsdesign zur *in vivo*-Analyse des Einflusses eines lokalen, durch einen Ischämie-Reperfusion-Prozess hervorgerufenen Schadens auf das Homing von c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen als geeignet zu betrachten.

4.3 Resultate

Das Homing von Knochenmarkstammzellen in traumatisierten Geweben ist fester Bestandteil der derzeitigen Theorie der stammzellbasierten Gewebe- und Organregeneration. Dieses Homing lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Die über das Blut durch das Kapillarsystem des geschädigten Gewebes zirkulierenden Stammzellen interagieren mit den Endothelien der Gefäßwände. Diese Interaktion wird mikroskopisch als Rolling und feste Adhäsion der Zellen an der Gefäßwand sichtbar. Anschließend kommt es zur transendothelialen Migration und letztlich zur Ansiedlung im Zielgewebe durch Fixierung in speziellen extravaskulären Nischen [89]. Die Beobachtung eines quantitativ veränderten Auftretens von Rolling und fester Adhäsion der c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen unter Applikation verschiedener Einflussfaktoren erlaubt eine Beurteilung der migrationsmodulierenden Wirkung dieser Faktoren.

4.3.1 Blutflussgeschwindigkeit

Ein Vergleich der Blutflussgeschwindigkeit der Versuchsgruppen erlaubt Rückschlüsse über die Mikrozirkulation innerhalb des M. cremaster. Eine stabile Mikrozirkulation ist zwingend erforderlich um den transplantierten Stammzellen einen Kontakt zu den Gefäßendothelien zu ermöglichen.

In den hier durchgeführten Experimenten ließ sich bezüglich der Blutflussgeschwindigkeiten kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Versuchsgruppen erkennen. Dies fundiert die Vergleichbarkeit der Gruppen bezüglich des Rolling und der Adhäsion der c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen, da eine Veränderung des Blutstroms als zusätzliche Einflussgröße ausgeschlossen werden kann. Jedoch stellten wir in der I/R-30/15 Versuchsgruppe häufiger einen vollständigen Zusammenbruch der Mikrozirkulation fest, welcher

zu einem Ausschluss der Aufnahmen aus der Auswertung der Ergebnisse führte. Eine mögliche Erklärung dieses Zusammenbruchs durch mikrothrombotische Prozesse wurde bereits dargestellt. Eine genaue Abklärung scheint vor einer Durchführung von Experimenten mit längerer Beobachtungsdauer empfehlenswert.

4.3.2 Rolling der c-kit⁺-Knochenmarksstammzelle

Die Beobachtung des bei der Migration in den extravasalen Raum initialen Schrittes darstellenden Rollens der Stammzellen am Gefäßendothel zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Interventionsgruppen. Bei den Tieren beider Interventionsgruppen ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Zunahme des Anteils rollender Stammzellen verzeichnen. Diese zeigte sich sowohl an den errechneten Mittelwerten als auch an den in Versuchsgruppen beobachteten Extremwerten. Zwischen beiden Interventionsgruppen war hingegen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Diese Ergebnisse unterstützen die These der ischämieinduzierten Expression migrationsfördernder Faktoren. Zur genaueren Spezifizierung dieser Faktoren ist die Durchführung einer RNA-Sequenzierung an den tiefgefrorenen Mm. cremaster geplant. Dieser Vorgang ist jedoch nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit. Als weiterer Einflussfaktor ist die Verlängerung der Zeit zwischen der Präparation und den intravitalmikroskopischen Aufnahmen zu erwähnen. In den beiden Interventionsgruppen nimmt diese jeweils um die Dauer der angesetzten Ischämie zu. Trotz möglichst schonender Behandlung und regelmäßiger Befeuchtung des M. cremaster kann ein umgebungsinduziertes zusätzliches Trauma des präparierten Muskels, welches wiederum Einfluss auf die Stammzellmigration haben könnte, nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss der Ischämiezeit noch genauer beurteilen zu können, empfiehlt sich eine Fortführung der Experimente mit weiteren Versuchsgruppen und einer Verlängerung der Ischämie.

4.3.3 Adhäsion der c-kit⁺-Knochenmarksstammzelle

Dem Rolling schließt sich das feste Anheften der Stammzellen an dem Gefäßendothel an. Dieses stellt den finalen Schritt dar, bevor die Stammzellen den intravasalen Raum verlassen. Bei der Auswertung der hier vorliegenden experimentellen Arbeit zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl der an der Gefäßwand adhärenen Stammzellen in der Interventionsgruppe mit 15 Minuten Ischämiezeit, welche sich zur Kontrollgruppe mehr als verdoppelte. Hierbei wird ein ausgeprägter migrationsfördernder Einfluss der Ischämie sichtbar, wobei als Störgröße erneut die verlängerte Exposition des Muskelgewebes gegenüber Umwelteinflüssen bedacht werden muss. Im Unterschied zum Rolling, bei welchem sich zwischen 15- und 30-minütiger Ischämiezeit

keine signifikanten Unterschiede zeigten, geht die beobachtete Adhärenz in der Interventionsgruppe mit 30-minütiger Ischämie nahezu auf die in der Kontrollgruppe erhobenen Ausgangswerte zurück. Diese Entwicklung lässt sowohl Rückschlüsse auf eine Zunahme durch die Ischämie freigesetzter migrationshemmender Faktoren als auch auf eine Reduktion der für die beständige Adhäsion notwendigen Rezeptoren zu.

4.3.4 Migrationsrelevante Zytokine, Rezeptoren und Liganden

Die derzeit zur Verfügung stehende Literatur verzichtet bei der Diskussion über die an der Migration beteiligten Faktoren weitestgehend auf eine genaue Unterscheidung der Beeinflussung von Stammzellrolling und fester Adhäsion. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse legen jedoch eine Divergenz zwischen den für beide Teilprozesse benötigten Zytokinen, Rezeptoren und Liganden bzw. deren Konzentration nahe. Daher scheint eine genauere Betrachtung der Interaktionsreihenfolge der involvierten Faktoren angebracht. Hierbei stützt sich diese Arbeit auf eine grafische Darstellung in einem 2010 von Yagi et al. veröffentlichtem Review [90].

Eine zentrale Rolle für die Stammzellmigration in ischämiegeschädigtes Gewebe stellt die Aktivierung einer proinflammatorischen Zytokinkaskade dar, welche zu erhöhten TNF- α - und IL-1 Konzentrationen führt.

Sowohl TNF- α als auch IL-1 stimulieren die endotheliale Expression des Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) [91] sowie eine erhöhte Dichte der komplementären Rezeptoren Integrin $\alpha 4\beta 1$, $\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ auf den Knochenmarkstammzellen [90]. Während das Review von Yagi et al. der Aktivierung von Integrin $\alpha 4\beta 1$ und $\beta 1$ eine eher auf Homing im Sinne einer Zellannäherung zwischen Endothel und Stammzelle beschränkte Rolle zuweist [90], berichteten andere Studien auch über eine Rolling und feste Adhäsion vermittelnde Funktion des auch als Very Late Antigen-4 (VLA-4) bezeichneten Integrin $\alpha 4\beta 1$ [92] bzw. eine Beteiligung von Integrin $\beta 1$ an der Ausbildung interzellulärer Adhäsion und der Migration von Leukozyten [93] und mesenchymaler Stammzellen [94]. Die Bindeaffinität von VLA-4 zu den extrazellulären Matrixkomponenten Fibronectin und Vitronectin wird durch eine Interaktion zwischen membrangebundenen SCF und dem c-kit-Rezeptor der Stammzellen moduliert [61]. Woldbaek et al. konnten eine Suppression der SCF-Level in postinfarziellen Myokard nachweisen [40]. Diese lässt sich durch eine durch Myokardinfarkt verursachte Erhöhung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- α [95], welche in *in vitro*-Studien ebenfalls zu einer Downregulation der SCF-Expression führten [40], erklären. Unter Annahme, dass diese dargestellten Interaktionsschritte sich stärker auf die feste Adhäsion als auf das Rolling der c-kit⁺-Stammzellen

auswirken, ergibt sich eine Erklärung des beobachteten Phänomens der abnehmenden Menge der festen Adhäsion aufweisenden Stammzellen mit verlängerter Ischämiezeit.

Weiterhin führt die erhöhte Konzentration von TNF- α und IL-1 zu einer gesteigerten Expression von endothelalem SDF-1, wie sie durch Askari et al. nach Myokardinfarkt gezeigt werden konnte [41]. Der Rezeptor dieses Chemokins ist CXCR4, ein normalerweise nur gering auf der Zelloberfläche von mesenchymalen Stammzellen exprimiertes Protein [96]. Jedoch ist die Translokation intrazellulär vorliegender Speicher von CXCR4 abhängig von diversen Zytokinen [97]. Sordi et al. konnten die Interaktion von CXCR4 mit SDF-1 in peripherem Gewebe nachweisen [98], welche zu einer Ausbildung interzellulärer Kontakte und Rolling der Stammzellen am Gefäßendothel führt [90]. Kaminski et al. spezifizierten die Abhängigkeit der durch SDF-1 initiierten Adhäsion der c-kit⁺-Stammzellen von der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [38]. Die Aktivität der eNOS und folgend die Verfügbarkeit von NO unterliegend weitreichenden Einfluss durch Ischämie- und Reperfusionsprozesse. In den ersten Minuten einer Ischämie nimmt die NO-Konzentration zu. Mit zunehmender Dauer der Ischämie nimmt sowohl die Expression, als auch die Aktivität der eNOS ab. Dies ist bedingt durch den Einfluss diverser, in ihrer Konzentration während myokardialer Ischämie zunehmender neurohumoraler Faktoren. Während Angiotensin II die Expression der eNOS fördert, überwiegt die Inhibition durch die zunehmende Gewebeazidose sowie das ansteigende Niveau freier Radikale und von TNF- α , welches einen eNOS-mRNA destabilisierenden Effekt hat. Ein Teil der NO-Produktion wird während der Ischämie jedoch von nicht-enzymatischen Prozessen übernommen. Während der Reperfusion lassen sich ähnliche Veränderungen beobachten. In den ersten Sekunden der Reperfusion lässt sich eine erneute Zunahme der eNOS-Aktivität verzeichnen. Im Laufe der Reperfusion fällt die NO-Konzentration jedoch unter die für Normoperfusion zu erwartenden Ausgangswerte [99]. Die zunächst mit zunehmender Ischämiedauer zunehmende, dann wieder zurück auf das Ausgangsniveau fallende Menge adhärenter c-kit⁺-Stammzellen ließe sich durch die abnehmende Verfügbarkeit von NO mit folgendem Wegfall der adhäsionsfördernden Wirkung von SDF-1 mit zunehmender Ischämiedauer erklären.

Weiterhin konnte in bereits erwähnter Studie von Kaminski et al. die Notwendigkeit einer Synergie von SDF-1 und TNF- α für die Ausbildung einer festen Adhäsion der Stammzellen am Gefäßendothel nachgewiesen werden [38]. Dies zeigt eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung von Stammzellmigration mit einer durch Ischämie veränderten Zytokinkomposition. Darüber hinaus wurden eine Förderung der Zelladhäsion an Endothelzellen

durch TNF- α über vermehrte Expression von ICAM-1, E-Selectin und CD44 beschrieben [100]. Ohne Interaktion mit TNF- α führt SDF-1 alleine hingegen ausschließlich zu einem vermehrten Rolling der c-kit⁺-Stammzellen, nicht zu vermehrter fester Adhäsion [38]. Da jedoch mit verlängerter Ischämiedauer nicht mit einer Abnahme der TNF- α -Level zu rechnen ist, scheinen diese Signalwege nicht grundlegend für die Ergebnisse dieser Arbeit zu sein.

Der festen Adhäsion der Stammzellen schließt sich die transendotheliale Migration in die extrazelluläre Matrix an. Diese unterliegt Einflüssen durch das bFGF-Niveau, durch TLR-abhängige Signalwege sowie durch mesenchymale Stammzellen gebildete Matrixmetalloproteasen-2. Insbesondere der Basic Fibroblast Growth Factor könnte dabei eine Erklärungsmöglichkeit für die hier vorliegenden Unterschiede bezüglich der Menge an adhärenen Stammzellen pro Gefäßoberfläche nach 15- und 30-minütiger Ischämie bieten. bFGF fördert die transendotheliale Migration über Aktivierung des Akt/Proteinkinase B-Signalweges. Dabei führen niedrige Konzentrationen des Proteins zu einer verstärkten Anziehung von mesenchymalen Stammzellen, hohe Konzentrationen hingegen zu einer Abstoßung [101]. Die Sekretion von bFGF durch Fibroblasten und Makrophagen [102] wird durch Ischämie gefördert. Aufgrund dieser Mechanismen lässt sich die Hypothese formulieren, dass eine verlängerte Ischämie des M. cremaster zu erhöhten bFGF-Konzentrationen führt, welche wiederum zur Abstoßung und damit zur beobachteten Verringerung der adhärenen c-kit⁺-Stammzellen führen würde.

Eine vergleichbare Begründung der Ergebnisse durch TLR-abhängige Signalwege scheint eher unwahrscheinlich. Zwar führt eine Sauerstoffminderversorgung von Gewebe zu einer vermehrten Freisetzung von HMGB-1 [103]. Jedoch beschrieben Furlani et. al eine gleichgerichtete Beeinflussung von Rolling und fester Adhäsion von c-kit⁺-Stammzellen durch die Interaktion von HMGB-1 mit endothelialen TLR-2 und TLR-4 [36].

5. Schlussfolgerung

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik zur Intravitalmikroskopie handelt es sich um ein etabliertes, standardisiertes und reproduzierbares Modell, welches zur Beobachtung des Homing von Knochenmarkstammzellen auf der Ebene der Mikrozirkulation geeignet ist. Zur Beurteilung der Migration sind Rolling und feste Adhäsion der fluoreszenzmarkierten Stammzellen am Gefäßendothel bewährte Parameter [104]. Die zur Unterbrechung der Blutversorgung des M. cremaster genutzte Abklemmung der versorgenden Gefäße erlaubt eine gute Steuerbarkeit von Ischämie und Reperfusion.

In der vorliegenden Studie konnte ein modulierender Einfluss der Ischämiezeit auf das Stammzellhoming nachgewiesen werden. Besonders die Fraktion der an der Gefäßwand rollenden Stammzellen zeigte in den Interventionsgruppen eine deutliche Zunahme.

Die vorliegenden Ergebnisse bieten eine Grundlage für weitere experimentelle Ansätze, deren Verfolgung vor einer potentiellen therapeutischen Anwendung unerlässlich ist. Eine Verlängerung der Ischämiezeit und eine Modulation der Reperfusionszeit kann dabei Rückschlüsse auf die Dauer der durch die Ischämie hervorgerufenen Veränderungen geben. Die Verwendung verschiedener genetischer knockout-Varianten als Versuchstiere würde eine Identifizierung der durch die Ischämie freigesetzten migrationsfördernden Transmitter und Rezeptoren bzw. ihre differenzierte Rolle bei Rolling und Adhäsion der Stammzellen erlauben. Ebenso empfiehlt sich die erwähnte molekularbiologische Aufarbeitung der Cremastermuskulatur der Versuchstiere zur Identifizierung der an der Migration beteiligten Rezeptoren und Transmitter, des zeitlichen Verlaufs ihrer jeweiligen Expressionslevel und die damit verbundene Beteiligung an Rolling und Adhäsion. Aufgrund der dargestellten Zusammenhänge ist mit zunehmender Ischämiedauer eine steigende Konzentration von bFGF, ein erhöhtes TNF- α -Level mit resultierender SCF-Downregulation sowie eine verminderte Verfügbarkeit von NO zu erwarten. Erst ein noch genaueres Verständnis der Grundlagen der dargestellten Vorgänge ermöglicht einen Rückschluss auf einen optimierten Durchführungszeitpunkt für eine kardiale Stammzelltherapie.

6. Literaturverzeichnis

1. Löwel, H.; Hörmann, A. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt; Robert Koch-Inst: Berlin, 2006
2. Gesundheitsberichterstattung des Bundes 08.01.2016. Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 100 häufigsten Todesursachen (ab 1998)
3. Vaupel, P.; Mutschler, E.; Schaible, H.-G. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 7., vollständig überarb. und erw. Aufl.; Wiss. Verl.-Ges: Stuttgart, 2015
4. Silbernagel, S.; Lang, F. Taschenatlas Pathophysiologie, 4. aktualisierte und erw. Aufl.; Thieme: Stuttgart, New York, NY, 2013
5. Herold, G. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis; Herold: Köln, 2016
6. Hamm, C.W.; Bassand, J.-P.; Agewall, S.; Bax, J.; Boersma, E.; Bueno, H.; Caso, P.; Dudek, D.; Gielen, S.; Huber, K.; et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). European heart journal 2011, 32, 2999–3054
7. Sun, Y. Infarct scar: A dynamic tissue. Cardiovascular Research 2000, 46, 250–256
8. Weisman, H.F.; Bush, D.E.; Mannisi, J.A.; Weisfeldt, M.L.; Healy, B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. Circulation 1988, 78, 186–201
9. Vracko, R.; Thorning, D.; Frederickson, R.G. Connective Tissue Cells in Healing Rat Myocardium. American Journal of Pathology 1989
10. Vandervelde, S.; van Luyn, M J A; Tio, R.A.; Harmsen, M.C. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. Journal of molecular and cellular cardiology 2005, 39, 363–376
11. Kaminski, A.; Donndorf, P.; Klopsch, C.; Steinhoff, G. Chirurgische intramyokardiale Stammzelltherapie bei chronischer Myokardischämie. Herz 2010, 35, 324–333

12. Pfeffer, M.A.; Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990, 81, 1161–1172
13. An, Y.; Kaji, S.; Kim, K.; Yamamuro, A.; Kinoshita, M.; Ehara, N.; Kobori, A.; Kitai, T.; Tani, T.; Kita, T.; et al. Successful thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention reduces infarct size and preserves myocardial viability: a cardiac magnetic resonance imaging study. *The Journal of invasive cardiology* 2011, 23, 172–176
14. Franccone, M.; Bucciarelli-Ducci, C.; Carbone, I.; Canali, E.; Scardala, R.; Calabrese, F.A.; Sardella, G.; Mancone, M.; Catalano, C.; Fedele, F.; et al. Impact of primary coronary angioplasty delay on myocardial salvage, infarct size, and microvascular damage in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: insight from cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology* 2009, 54, 2145–2153
15. Lotan, C.; Gurevitz, J.; Mosseri, M.; Weiss, T.A.; Welber, S.; Sapoznikov, D.; Rosenheck, S.; Admon, D.; Hasin, Y.; Gotsman, M.S. Changes in ventricular function and coronary stenosis after successful intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction. *Cardiology* 1988, 419–430
16. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S.M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D.M.; et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001, 410, 701–705
17. Jackson, K.A.; Majka, S.M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C.J.; Majesky, M.W.; Entman, M.L.; Michael, L.H.; Hirschi, K.K.; Goodell, M.A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001, 107, 1395–1402
18. Kaminski, A.; Steinhoff, G. Current status of intramyocardial bone marrow stem cell transplantation. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 2008, 20, 119–125
19. Donndorf, P.; Kaminski, A.; Tiedemann, G.; Kundt, G.; Steinhoff, G. Validating intramyocardial bone marrow stem cell therapy in combination with coronary artery bypass grafting, the PERFECT Phase III randomized multicenter trial: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2012, 13, 99
20. Hong, K.U.; Bolli, R. Cardiac stem cell therapy for cardiac repair. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 2014, 16, 324

21. Sanganalmath, S.K.; Bolli, R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation research* 2013, 113, 810–834
22. Donndorf, P.; Strauer, B.-E.; Steinhoff, G. Update on cardiac stem cell therapy in heart failure. *Current opinion in cardiology* 2012, 27, 154–160
23. Tang, X.-L.; Rokosh, G.; Sanganalmath, S.K.; Tokita, Y.; Keith, M.C.L.; Shirk, G.; Stowers, H.; Hunt, G.N.; Wu, W.; Dawn, B.; et al. Effects of Intracoronary Infusion of Escalating Doses of Cardiac Stem Cells in Rats With Acute Myocardial Infarction. *Circulation. Heart failure* 2015, 8, 757–765
24. Fuchs, S.; Baffour, R.; Zhou, Y.F.; Shou, M.; Pierre, A.; Tio, F.O.; Weissman, N.J.; Leon, M.B.; Epstein, S.E.; Kornowski, R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *Journal of the American College of Cardiology* 2001, 37, 1726–1732
25. Sheng, C.C.; Zhou, L.; Hao, J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *BioMed research international* 2013, 2013, 547902
26. Thompson, C.A.; Nasser, B.A.; Makower, J.; Houser, S.; McGarry, M.; Lamson, T.; Pomerantseva, I.; Chang, J.Y.; Gold, H.K.; Vacanti, J.P.; et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *Journal of the American College of Cardiology* 2003, 41, 1964–1971
27. Siminiak, T.; Fiszer, D.; Jerzykowska, O.; Grygielska, B.; Rozwadowska, N.; Kalmucki, P.; Kurpisz, M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *European heart journal* 2005, 26, 1188–1195
28. Tang, X.-L.; Rokosh, G.; Sanganalmath, S.K.; Yuan, F.; Sato, H.; Mu, J.; Dai, S.; Li, C.; Chen, N.; Peng, Y.; et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010, 121, 293–305
29. Johnston, P.V.; Sasano, T.; Mills, K.; Evers, R.; Lee, S.-T.; Smith, R.R.; Lardo, A.C.; Lai, S.; Steenbergen, C.; Gerstenblith, G.; et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits

- of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009, 120, 1075-83
30. Li, Q.; Guo, Y.; Ou, Q.; Chen, N.; Wu, W.-J.; Yuan, F.; O'Brien, E.; Wang, T.; Luo, L.; Hunt, G.N.; et al. Intracoronary administration of cardiac stem cells in mice: a new, improved technique for cell therapy in murine models. *Basic research in cardiology* 2011, 106, 849–864
 31. Abdel-Latif, A.; Bolli, R.; Tleyjeh, I.M.; Montori, V.M.; Perin, E.C.; Hornung, C.A.; Zuba-Surma, E.K.; Al-Mallah, M.; Dawn, B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine* 2007, 167, 989–997
 32. Assmus, B. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002, 106, 3009–3017
 33. Assmus, B.; Honold, J.; Schächinger, V.; Britten, M.B.; Fischer-Rasokat, U.; Lehmann, R.; Teupe, C.; Pistorius, K.; Martin, H.; Abolmaali, N.D.; et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2006, 355, 1222–1232
 34. Strauer, B.E. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation* 2002, 106, 1913–1918
 35. Rezkalla, S.H. No-Reflow Phenomenon. *Circulation* 2002, 105, 656–662
 36. Furlani, D.; Donndorf, P.; Westien, I.; Ugurlucan, M.; Pittermann, E.; Wang, W.; Li, W.; Vollmar, B.; Steinhoff, G.; Kaminski, A.; et al. HMGB-1 induces c-kit⁺ cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 of endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012, 16, 1094–1105
 37. Donndorf, P.; Useini, D.; Lux, C.A.; Vollmar, B.; Delyagina, E.; Laupheimer, M.; Kaminski, A.; Steinhoff, G. Analyzing migratory properties of human CD133(+) stem cells in vivo after intraoperative sternal bone marrow isolation. *Cell transplantation* 2013, 22, 1627–1635
 38. Kaminski, A.; Ma, N.; Donndorf, P.; Lindenblatt, N.; Feldmeier, G.; Ong, L.-L.; Furlani, D.; Skrabal, C.A.; Liebold, A.; Vollmar, B.; et al. Endothelial NOS is required for SDF-1 α /CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit⁺ bone marrow stem cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2008, 88, 58–69

39. Valgimigli, M.; Rigolin, G.M.; Fucili, A.; Della Porta, M.; Soukhomovskaia, O.; Malagutti, P.; Bugli, A.M.; Bragotti, L.Z.; Francolini, G.; Mauro, E.; et al. CD34⁺ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004, 110, 1209–1212
40. Woldbaek, P.R.; Hoen, I.B.; Christensen, G.; Tønnessen, T. Gene expression of colony-stimulating factors and stem cell factor after myocardial infarction in the mouse. *Acta physiologica Scandinavica* 2002, 175, 173–181
41. Askari, A.T.; Unzek, S.; Popovic, Z.B.; Goldman, C.K.; Forudi, F.; Kiedrowski, M.; Rovner, A.; Ellis, S.G.; Thomas, J.D.; DiCorleto, P.E.; et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *The Lancet* 2003, 362, 697–703
42. Ma, J.; Ge, J.; Zhang, S.; Sun, A.; Shen, J.; Chen, L.; Wang, K.; Zou, Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic research in cardiology* 2005, 100, 217–223
43. Wang, Y.; Johnsen, H.E.; Mortensen, S.; Bindslev, L.; Ripa, R.S.; Haack-Sørensen, M.; Jørgensen, E.; Fang, W.; Kastrup, J. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart (British Cardiac Society)* 2006, 92, 768–774
44. Ter Horst, K.W. Stem cell therapy for myocardial infarction: are we missing time? *Cardiology* 2010, 117, 1–10
45. Li, R.-K.; Mickle, D.A.; Weisel, R.D.; Rao, V.; Jia, Z.-Q. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *The Annals of Thoracic Surgery* 2001, 72, 1957–1963
46. Qiu, F.H.; Ray, P.; Brown, K.; Barker, P.E.; Jhanwar, S.; Ruddle, F.H.; Besmer, P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *The EMBO Journal* 1988, 7, 1003–1011

47. Yarden, Y.; Kuang, W.J.; Yang-Feng, T.; Coussens, L.; Munemitsu, S.; Dull, T.J.; Chen, E.; Schlessinger, J.; Francke, U.; Ullrich, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal* 1987, 6, 3341–3351
48. Cambareri, A.C.; Ashman, L.K.; Cole, S.R.; Lyons, A.B. A monoclonal antibody to a human mast cell/myeloid leukaemia-specific antigen binds to normal haemopoietic progenitor cells and inhibits colony for... - PubMed - NCBI. *Leukemia Research* 1988, 929–939
49. Ashman, L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999, 31, 1037–1051
50. Martin, F.H.; Suggs, S.V.; Langley, K.E.; Lu, H.S.; Ting, J.; Okino, K.H.; Morris, C.; McNiece, I.K.; Jacobsen, F.W.; Mendl, E.A.; et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990, 63, 203–211
51. Williams, D.E.; Eisenman, J.; Baird, A.; Rauch, C.; van Ness, K.; March, C.J.; Park, L.S.; Martin, U.; Mochizuki, D.Y.; Boswell, H.; et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990, 63, 167–174
52. Witte, O.N. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 1990, 63, 5–6
53. Huang, E.; Nocka, K.; Beier, D.R.; Chu, T.-Y.; Buck, J.; Lahm, H.-W.; Wellner, D.; Leder, P.; Besmer, P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990, 63, 225–233
54. Flanagan, J.G.; Leder, P. The kit ligand: A cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 1990, 63, 185–194
55. Aye, M.T.; Hashemi, S.; Leclair, B.; Zeibdawi, A.; Trudel, E.; Halpenny, M.; Fuller, V.; Cheng, G. Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). - PubMed - NCBI. *Experimental Hematology* 1992, 523–527
56. Heinrich, M.C.; Dooley, D.C.; Freed, A.C.; Band, L.; Hoatlin, M.E.; Keeble, W.W.; Peters, S.T.; Silvey, K.V.; Ey, F.S.; Kabat, D. Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. *Blood* 1993, 82, 771–783
57. Toksoz, D.; Zsebo, K.M.; Smith, K.A.; Hu, S.; Brankow, D.; Suggs, S.V.; Martin, F.H.; Williams, D.A. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the

- human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89, 7350–7354
58. Okumura, N.; Tsuji, K.; Ebihara, Y.; Tanaka, I.; Sawai, N.; Koike, K.; Komiyama, A.; Nakahata, T. Chemotactic and chemokinetic activities of stem cell factor on murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996, 4100–4108
 59. Kaneko, Y.; Takenawa, J.; Yoshida, O.; Fujita, K.; Sugimoto, K.; Nakayama, H.; Fujita, J. Adhesion of mouse mast cells to fibroblasts: adverse effects of steel (Sl) mutation. *Journal of cellular physiology* 1991, 147, 224–230
 60. Kinashi, T.; Springer, T.A. Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* 1994, 1033–1038
 61. Levesque, J.P. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *Journal of Experimental Medicine* 1995, 181, 1805–1815
 62. Beltrami, A.P.; Barlucchi, L.; Torella, D.; Baker, M.; Limana, F.; Chimenti, S.; Kasahara, H.; Rota, M.; Musso, E.; Urbanek, K.; et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 2003, 114, 763–776
 63. Assmus, B.; Iwasaki, M.; Schächinger, V.; Roewe, T.; Koyanagi, M.; Iekushi, K.; Xu, Q.; Tonn, T.; Seifried, E.; Liebner, S.; et al. Acute myocardial infarction activates progenitor cells and increases Wnt signalling in the bone marrow. *European heart journal* 2012, 33, 1911–1919
 64. Catlett, J.P.; Leftwich, J.A.; Westin, E.H.; Grant, S.; Huff, T.F. c-kit Expression by CD34⁺ Bone Marrow Progenitors and Inhibition of Response to Recombinant Human Interleukin-3 Following Exposure to c-kit Antisense Oligonucleotides. *Blood* 1991, 3186–3191
 65. Putman, D.M.; Liu, K.Y.; Broughton, H.C.; Bell, G.I.; Hess, D.A. Umbilical cord blood-derived aldehyde dehydrogenase-expressing progenitor cells promote recovery from acute ischemic injury. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012, 30, 2248–2260
 66. Fazel, S.; Cimini, M.; Chen, L.; Li, S.; Angoulvant, D.; Fedak, P.; Verma, S.; Weisel, R.D.; Keating, A.; Li, R.-K. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 2006, 116, 1865–1877

67. Donndorf, P.; Steinhoff, G. CD133-Positive Cells for Cardiac Stem Cell Therapy: Current Status and Outlook. *Advances in experimental medicine and biology* 2013, 777, 215–227
68. Donndorf, P.; Ludwig, M.; Wildschütz, F.; Useini, D.; Kaminski, A.; Vollmar, B.; Steinhoff, G. Intravital microscopy of the microcirculation in the mouse cremaster muscle for the analysis of peripheral stem cell migration. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2013, e50485
69. Papadimitriou, D.; Xanthos, T.; Dontas, I.; Lelovas, P.; Perrea, D. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Laboratory animals* 2008, 42, 265–276
70. Gratwohl, A.; Hermans, J.; Goldman, J.M.; Arcese, W.; Carreras, E.; Devergie, A.; Frassoni, F.; Gahrton, G.; Kolb, H.J.; Niederwieser, D.; et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. *The Lancet* 1998, 352, 1087–1092
71. Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990, 11, 231–238
72. Jaber, S.M.; Hankenson, F.C.; Heng, K.; McKinstry-Wu, A.; Kelz, M.B.; Marx, J.O. Dose Regimens, Variability, and Complications Associated with Using Repeat-Bolus Dosing to Extend a Surgical Plane of Anesthesia in Laboratory Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2014, 53, 684–691
73. Baez, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular Research* 1973, 5, 384–394
74. Grant, R.T. Direct observation of skeletal muscle blood vessels (rat cremaster). *The Journal of Physiology* 1964, 172, 123–137
75. Grant, R.T.; Wright, H.P. Further observations on the blood vessels of skeletal muscle (rat cremaster). *Journal of Anatomy* 1968, 103, 553–565
76. Hungerford, J.E.; Sessa, W.C.; Segal, S.S. Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle. *FASEB J* 2000, 197–207
77. Bagher, P.; Segal, S.S. The Mouse Cremaster Muscle Preparation for Intravital Imaging of the Microcirculation. *JoVE* 2011

78. Furlani, D.; Ugurlucan, M.; Ong, L.; Bieback, K.; Pittermann, E.; Westien, I.; Wang, W.; Yerebakan, C.; Li, W.; Gaebel, R.; et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Microvascular Research* 2009, 77, 370–376
79. Roberts, G.M.; Roberts, E.E.; Davies, R.L.; Lawrie, B.W. Thrombogenicity of arterial catheters and guidewires. *BJR* 1977, 50, 415–418
80. Proctor, K.G.; Busija, D.W. Relationships among arteriolar, regional, and whole organ blood flow in cremaster muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1985, 249, H34-H41
81. Thiele, J.R.; Goerendt, K.; Stark, G.B.; Eisenhardt, S.U. Real-time Digital Imaging of Leukocyte-endothelial Interaction in Ischemia-reperfusion Injury (IRI) of the Rat Cremaster Muscle. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012
82. Ebina, K. [A study on histological changes of the intracranial arteries after permanent clipping or ligation.--Part II. Autopsy cases of aneurysmal neck clipping (author's transl)]. *No Shinkei Geka* 1980, 343–354
83. Gavins, F.N.; Chatterjee, B.E. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2004, 49, 1–14
84. Dansker, V.L. Method of intravital microscopy of the blood vessels in the rabbit ear. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni I. M. Sechenova* 1958, 62–67
85. Björk, J.; Smedegård, G. Acute microvascular effects of PAF-acether, as studied by intravital microscopy. *European Journal of Pharmacology* 1983, 96, 87–94
86. Wiedeman, M.P. Preparation of the bat wing for in vivo microscopy. *Microvascular Research* 1973, 417–422
87. Takeichi, T.; Engelmann, G.; Mocevicius, P.; Schmidt, J.; Ryschich, E. 4-Dimensional Intravital Microscopy: A New Model for Studies of Leukocyte Recruitment and Migration in Hepatocellular Cancer in Mice. *J Gastrointest Surg* 2010, 14, 867–872
88. Herr, N.; Mauler, M.; Bode, C.; Duerschmied, D. Intravital Microscopy of Leukocyte-endothelial and Platelet-leukocyte Interactions in Mesenteric Veins in Mice. *JoVE* 2015
89. Lapidot, T. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005, 106, 1901–1910

90. Yagi, H.; Soto-Gutierrez, A.; Parekkadan, B.; Kitagawa, Y.; Tompkins, R.G.; Kobayashi, N.; Yarmush, M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell transplantation* 2010, 19, 667–679
91. Wu, T.-C. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer research* 2007, 67, 6003–6006
92. Jacobsen, K.; Kravitz, J.; Kincade, P.W.; Osmond, D.G. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 1996, 87, 73–82
93. Werr, J.; Xie, X.; Hedqvist, P.; Ruoslahti, E.; Lindbom, L. β 1 Integrins Are Critically Involved in Neutrophil Locomotion in Extravascular Tissue In Vivo. *J Exp Med* 1998, 187, 2091–2096
94. Ip, J.E.; Wu, Y.; Huang, J.; Zhang, L.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Mesenchymal stem cells use integrin β 1 not CXCR4 chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Molecular biology of the cell* 2007, 18, 2873–2882
95. Kapadia, S.R. Cytokines and heart failure. *Cardiology in review* 1999, 7, 196–206
96. Wynn, R.F.; Hart, C.A.; Corradi-Perini, C.; O'Neill, L.; Evans, C.A.; Wraith, J.E.; Fairbairn, L.J.; Bellantuono, I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004, 104, 2643–2645
97. Wang, J.; Guan, E.; Roderiquez, G.; Calvert, V.; Alvarez, R.; Norcross, M.A. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276, 49236–49243
98. Sordi, V.; Malosio, M.L.; Marchesi, F.; Mercalli, A.; Melzi, R.; Giordano, T.; Belmonte, N.; Ferrari, G.; Leone, B.E.; Bertuzzi, F.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005, 106, 419–427
99. Schulz, R.; Kelm, M.; Heusch, G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2004, 61, 402–413

100. Mackay, F.; Loetscher, H.; Stueber, D.; Gehr, G.; Lesslauer, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993, 177, 1277–1286
101. Schmidt, A.; Ladage, D.; Schinkothe, T.; Klausmann, U.; Ulrichs, C.; Klinz, F.-J.; Brixius, K.; Arnhold, S.; Desai, B.; Mehlhorn, U.; et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006, 24, 1750–1758, doi:10.1634/stemcells.2005-0191
102. Kuwabara, K.; Ogawa, S.; Matsumoto, M.; Koga, S.; Clauss, M.; Pinsky, D.J.; Lyn, P.; Leavy, J.; Witte, L.; Joseph-Silverstein, J. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995, 92, 4606–4610
103. Li, Q.; Yu, B.; Yang, P. Hypoxia-induced HMGB1 in wound tissues promotes the osteoblast cell proliferation via activating ERK/JNK signaling. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015, 8, 15087–15097
104. Quesenberry, P.J.; Becker, P.S. Stem cell homing: Rolling, crawling, and nesting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95, 15155–15157

7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässiger Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Weitere Personen waren an der geistigen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, 01.03.2017

Fabian Wildschütz

9. Thesen zur Dissertation

1. Tierexperimentelle Studien sind für die die Migration von Stammzellen und die Stammzell-Endothelzell-Interaktion betreffende Grundlagenforschung unverzichtbar.
2. Die Stammzelltherapie bietet vielversprechende Ansätze für die Behandlung des akuten Koronarsyndroms und der chronisch ischämischen Herzerkrankung.
3. Das Modell der Cremasterpräparation zur Intravitalmikroskopie stellt eine etablierte und zuverlässige Methode zur in vivo-Beobachtung transplanteder fluoreszenzmarkierter Stammzellen und deren Interaktion mit den Gefäßwänden dar.
4. Der Vorgang des Stammzellhoming lässt sich durch die Phänomene des Rolling und der Adhäsion der markierten Stammzellen quantifizieren.
5. Ischämie- und Reperusionszeiten haben einen migrationsmodulierenden Einfluss auf das Homing von murinen c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen *in vivo*.
6. Der Anteil der frühe endotheliale Interaktion (Rolling) zeigenden c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen nimmt mit zunehmender Ischämiedauer zu.
7. Für die feste endotheliale Adhäsion der c-kit⁺-Knochenmarkszellen zeigt sich mit zunehmender Ischämiedauer zunächst eine Zunahme, anschließend eine Abnahme zurück auf das Ausgangsniveau.
8. Die Erforschung dieser Modulation erlaubt Rückschlüsse bezüglich eines optimierten Behandlungsregimes für Patienten mit ACS oder chronisch ischämischer Herzerkrankung.